

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Πρωτομική μελέτη της απόκρισης του *Mytilus galloprovincialis* σε βαρέα
μέταλλα**

Μπούντης Σταύρος

Τριμελής Επιτροπή:

**Κοντού Μαρία,
Επίκουρος
Καθηγήτρια**

**Σαμιωτάκη Μαρτίνα,
Επιστημονικό προσωπικό
του ερευνητικού κέντρου
«Αλέξανδρος Φλέμινγκ»**

**Σκαμνάκη Βασιλική,
Λέκτορας**

UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

Proteomic study of *Mytilus galloprovincialis* response to heavy metals

Bountis Stavros

Supervisor: Kontou Maria, Associate Professor

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Mytilus galloprovincialis* είναι ένας οργανισμός, που όπως και αρκετοί άλλοι της τάξης των Διθύρων, έχει την ικανότητα να συσσωρεύει και να είναι ανθεκτικός σε υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ρύπων, μεταξύ των άλλων και βαρέα μέταλλα. Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα έχει δυσμενείς επιπτώσεις στους οργανισμούς, καθώς προάγουν τη δημιουργία ROS. Οι ROS μπορούν να οξειδώσουν τις πρωτεΐνες με πολλούς τρόπους, ορισμένοι από τους οποίους οδηγούν στην εμφάνιση καρβονυλομάδων. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι μια μη αναστρέψιμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που συχνά οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πρωτεομική απόκριση του *Mytilus galloprovincialis* ύστερα από έκθεση στα βαρέα μέταλλα Cu, Hg, Cd, δίνοντας έμφαση στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες, που αποτελούν ένα αναπόσπαστο τμήμα των ριβοσωμάτων, τις πρωτεϊνοσυνθετικές μηχανές των κυττάρων. Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με τα προγράμματα MaxQuant και Perseus, λογισμικά σχεδιασμένα για πρωτεομική μελέτη.

ABSTRACT

The mussel *Mytilus galloprovincialis*, like many other species in the class Bivalvia, possess the ability to accumulate and endure high concentrations of toxic pollutants, including amongst others heavy metals. Exposure of organisms to heavy metals has severe consequences, since they can promote the production of ROS. ROS can oxidize proteins in many ways, some of which result in the addition of carbonyl groups. The carbonylation of proteins is a type of irreversible post-translational modification which can lead to loss of function. This essay focus was to study the proteomic response of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to the heavy metals Cu, Hg, Cd, with emphasis being given to ribosomal proteins, which constitute an integral part of ribosomes, the engines of protein synthesis of cells. The protein analysis was performed with the MaxQuant and Perseus software, which both are software specifically designed for proteomic studies.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
2.1 <u>Ο οργανισμός Mytilus galloprovincialis.....</u>	5
2.2 <u>Έκθεση των οργανισμών σε βαρέα μέταλλα.....</u>	6
I) <u>Υδράργυρος.....</u>	6
II) <u>Κάδμιο.....</u>	7
III) <u>Χαλκός.....</u>	7
2.3 <u>Ριβοσώματα και ριβοσωμικές πρωτεΐνες.....</u>	8
2.4 <u>Οξειδωτικό στρες και καρβονυλίωση πρωτεϊνών.....</u>	10
I) <u>Δημιουργία ROS και οξειδωτικό στρες.....</u>	10
II) <u>Οξείδωση – καρβονυλίωση πρωτεϊνών.....</u>	11
3. ΣΤΟΧΟΣ.....	13
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
4.1 <u>Επεξεργασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων μέσω φασματομετρίας μάζας.....</u>	14
4.2 <u>Ανασκόπηση οξειδωτικών τροποποιήσεων αμινοξέων.....</u>	15
4.3 <u>Εκτέλεση του προγράμματος MaxQuant με τα raw αρχεία.....</u>	18
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	21
5.1 <u>Στατιστική επεξεργασία των ανιχνευθέντων πρωτεϊνών με το Perseus.....</u>	21
5.2 <u>Στατιστική επεξεργασία των τροποποιημένων πεπτιδίων των ριβοσωμικών πρωτεϊνών με το Perseus.....</u>	27
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	33

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο οργανισμός *Mytilus galloprovincialis*

Τα μαλάκια είναι ένα από τα πιο ποικιλόμορφα ζωικά φύλα και αποτελούν ένα καίριο συστατικό των θαλάσσιων οικοσυστημάτων καθώς αποτελούν περίπου το ένα τέταρτο όλων των γνωστών θαλάσσιων ειδών [1]. Από τον κλάδο αυτό, τα δίθυρα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχουν τεράστια σημασία για τα θαλάσσια οικοσυστήματα ενώ ταυτόχρονα περιέχουν πολλά είδη που αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για τον άνθρωπο. Πολλά είδη μαλακίων χρησιμοποιούνται ως ερευνητικά μοντέλα για τη μελέτη της νευροβιολογίας, της προσαρμογής στα παράκτια περιβάλλοντα, της οξέωσης του ωκεανού και των κλιματικών αλλαγών καθώς και της μόλυνσης των υδάτων. Παρ' όλα αυτά, το γονίδωμα των μαλακίων και ιδιαίτερα των δίθυρων παραμένει πτωχά μελετημένο [2].

Το Μεσογειακό μύδι, *Mytilus galloprovincialis*, είναι ένα θαλάσσιο μαλάκιο που ανήκει στην οικογένεια Mytilidae. Είναι ένα εισβάλλον είδος το οποίο εξακμάζει στις παράκτιες περιοχές και είναι ευρέως διαδεδομένο στη Μεσογειακή Θάλασσα, τη Μαύρη Θάλασσα ενώ βρίσκεται σε συνδυασμό με το *Mytilus edulis* στις Ατλαντικές ακτές της Γαλλίας, της Μεγάλης Βρετανίας και της Ιρλανδίας [1]. Τα μύδια παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα ως οργανισμοί μοντέλα αφού είναι άμισχα, δηλαδή προσκολλώνται σε σκληρές επιφάνειες και παραμένουν ως επί το πλείστον αμετακίνητα, συνιστώντας ένα σημαντικό μέρος του οικοσυστήματος στο οποίο βρίσκονται, είναι διαθέσιμα σε μεγάλες ποσότητες, ενώ είναι εξαιρετικά χρήσιμοι ως βιομάρτυρες της θαλάσσιας ρύπανσης λόγω της ευρείας εξάπλωσής τους και της ιδιότητας τους να συσσωρεύουν και να είναι ανθεκτικοί σε μεγάλες ποσότητες ξενοβιοτικών ουσιών (βιομηχανικοί ρύποι, βαρέα μέταλλα κ.α.) [3]. Επίσης έχουν μεγάλη εμπορική σημασία, καθώς αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό των υδατοκαλλιεργειών. Τα μύδια, αλλά και γενικά τα δίθυρα όπως προαναφέρθηκε, προσφέρονται ιδιαίτερα για διαφόρων ειδών μελετών καθώς επιβιώνουν σε αντίξοα περιβάλλοντα. Σε αυτά τα περιβάλλοντα υφίστανται διακυμάνσεις στη θερμοκρασία, στη αλατότητα, στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου καθώς και αναλόγως με την περιοχή και στη μολυσματικότητα των υδάτων. Ωστόσο, προτεομικές μελέτες που αποσκοπούν στην κατανόηση της βιολογίας τους είναι ιδιαίτερα δύσκολες καθώς οι γνώσεις μας για τα γονίδια και τα επίπεδα έκφραση τους σε φυσιολογικές και μολυσμένες περιοχές είναι αρκετά περιορισμένες [2].

1.2 Έκθεση των οργανισμών σε βαρέα μέταλλα

Η θαλάσσια ρύπανση είναι ένα φαινόμενο το οποίο τα τελευταία χρόνια έχει πάρει ανησυχητικές διαστάσεις και το οποίο έχει καταστροφικές συνέπειες για τα θαλάσσια οικοσυστήματα και για τους οργανισμούς που ζουν σε αυτά. Ανάμεσα στους ρύπους που φτάνουν στις θάλασσες συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων και διάφορα μέταλλα, όπως Cd, Hg, Ag, Co, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, πολλά εκ των οποίων μάλιστα σε συγκεντρώσεις που δύναται να είναι τοξικές για την υδρόβια ζωή, καθώς συσσωρεύονται στους ιστούς των θαλάσσιων οργανισμών [4].

Τα βαρέα μέταλλα χαρακτηρίζονται ως μεταλλικά στοιχεία τα οποία έχουν μια μεγάλη σχετικά πυκνότητα, σε σχέση με το νερό. Αν και τα βαρέα μέταλλα ανευρίσκονται φυσιολογικά στον φλοιό της γης, το μεγαλύτερο μέρος της περιβαλλοντικής μόλυνσης που οφείλεται σε αυτά προέρχεται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως η εξόρυξη, βιομηχανικές διαδικασίες καθώς και η οικιακή και αγροτική χρήση βαρέων μετάλλων ή ενώσεων που περιέχουν αυτά [5]. Στις βιομηχανικές διαδικασίες περιλαμβάνονται η επεξεργασία μετάλλων σε διυλιστήρια, η καύση γαιάνθρακα, η καύση πετρελαίου, τα πυρηνικά εγροστάσια και διαφόρων ειδών άλλα εργοστάσια όπως επεξεργασίας πλαστικών, μικροηλεκτρονικών συσκευών, υφασμάτων, επεξεργασίας χαρτιού κ.α. Φυσικά φαινόμενα όπως διάφορα καιρικά φαινόμενα και ηφαιστιογενής δραστηριότητα συνεισφέρουν επίσης σε σημαντικό βαθμό στη μόλυνση του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα.

Ορισμένα από τα βαρέα μέταλλα, όπως ο χαλκός, το κοβάλτιο, το χρώμιο, ο σίδηρος, το μαγνήσιο, το μαγγάνιο, το νικέλιο, το σελήνιο και ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητα ως θρεπτικά συστατικά καθώς εμπλέκονται σε πολλές σημαντικές φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες σε ζώα [6]. Αποτελούν σημαντικά συστατικά αρκετών ενζύμων που διαδραματίζουν καίριους ρόλους σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Ωστόσο η έκθεση των οργανισμών σε βαρέα μέταλλα είναι βλαπτική, ιδιαίτερα σε αυτά που δεν έχουν κανένα φυσιολογικό ρόλο. Ακόμη όμως και σε αυτά που είναι απαραίτητα, όπως ο χαλκός, υπάρχει συνήθως μια στενή σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων που είναι ευεργετικές και εκείνες που καθίστανται τοξικές [7].

Ι) Υδράργυρος

Ο υδράργυρος (Hg) είναι ένα μοναδικό στοιχείο από την άποψη ότι συναντάται στη φύση σε τρεις μορφές (στοιχειακή, ανόργανη, οργανική), κάθε μία από τις οποίες συμπεριφέρεται διαφορετικά όσον αφορά τη τοξικότητα της. Στη στοιχειακή του μορφή (Hg^0), σε θερμοκρασία δωματίου, ο υδράργυρος είναι ένα λευκόχρωμο υγρό. Ο υδράργυρος υπάρχει επίσης ως κατιόν σε δύο οξειδωτικές καταστάσεις, Hg^{1+} και Hg^{2+} . Ο μεθυλϋδράργυρος είναι η πιο συχνά απαντώμενη μορφή του οργανικού υδραργύρου. Ο υδράργυρος έχει πολυάριθμες εφαρμογές σε πολλούς τομείς όπως στη βιομηχανία ηλεκτρικών ειδών (διακόπτες, θερμοστάτες, μπαταρίες), στην οδοντιατρική, στη φαρμακοβιομηχανία, στη γεωργία (φυτοφάρμακα) και στην εξόρυξη πολύτιμων μετάλλων [5].

Η τοξικότητα του υδραργύρου είναι στενά σχετιζόμενη με την αύξηση των επιπέδων ROS, δηλαδή με την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Ο υδράργυρος έχει μεγάλη συγγένεια για σουλφυδρυλικές ομάδες. Άπαξ και εισέλθει στο κύτταρο ο υδράργυρος σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με κατάλοιπα κυστεΐνης πρωτεϊνών, οδηγώντας στην εξάλειψη των αντιοξειδωτικών μορίων, γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση ROS, οι οποίες στην πορεία προκαλούν οξειδωτικές βλάβες. Επίσης, ο υδράργυρος μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA μέσω της παραγωγής ROS που είτε αλληλεπιδρούν άμεσα με το DNA είτε με πρωτεΐνες υπεύθυνες για το σχηματισμό και τη συντήρηση του DNA [5].

II) Κάδμιο

Το κάδμιο (Cd) είναι ένα φυσικό στοιχείο του φλοιού της γης. Είναι ένα εύπλαστο λευκό μέταλλο το οποίο ανήκει στην 12^η ομάδα του περιοδικού πίνακα. Τα υψηλότερα επίπεδα καδμίου στο περιβάλλον συσσωρεύονται στα ιζηματογενή πετρώματα. Το κάδμιο χρησιμοποιείται συχνά στη βιομηχανία με κύριες εφαρμογές την παραγωγή κραμάτων, χρωμάτων και μπαταριών. Αποτελεί ένα από τα κύρια μέταλλα που διασπείρονται στα υδάτινα οικοσυστήματα, με ανθρωπογενείς παράγοντες να αποτελούν την κύρια αιτία της μόλυνσης αυτών των οικοσυστημάτων με Cd [5]. Συνεπώς, λόγω περιβαλλοντικών ανησυχιών καθώς και κινδύνων για τη δημόσια υγεία η χρήση του έχει περιορισθεί τα τελευταία χρόνια στις ανεπτυγμένες χώρες.

Το κάδμιο προκαλεί αρκετές βλάβες στα κύτταρα κυρίως μέσω της παραγωγής ROS. Το μέταλλο αυτό, όμως, δεν είναι οξειδοαναγωγικά ενεργό και το οξειδωτικό στρες που επάγει προκύπτει από έμμεσες διαδικασίες, όπως η πρόσδεσή του σε αντιοξειδωτικά μόρια (γλουταθειόνη, μεταλοθειονίνες), η μείωση των οποίων προκαλεί συσσώρευση ROS. Αυτές με τη σειρά τους προκαλούν βλάβες στο DNA, οξείδωση πρωτεϊνών, υπεροξείδωση λιπιδίων, μεμβρανικές βλάβες, διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης γονιδίων και απόπτωση [8]. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι το κάδμιο συσσωρεύεται στα θαλάσσια ασπόνδυλα [9,10,11], που είναι και ένας από τους λόγους που χρησιμοποιούνται ως οργανισμοί βιοδείκτες της θαλάσσιας ρύπανσης.

III) Χαλκός

Ο χαλκός (Cu) είναι ένα απαραίτητα μέταλλο για τη ζωή του κυττάρου. Η σημασία του οφείλεται στην ικανότητά του να αλλάζει την κατάσταση οξείδωσής του από Cu^+ σε Cu^{2+} και αντίστροφα, δρώντας είτε ως δότης είτε ως δέκτης ηλεκτρονίων [12]. Ο χαλκός αποτελεί ένα απαραίτητο συστατικό πολλών ενζύμων όπως της κυτοχρωμικής οξειδάσης c, της σουπεροξειδικής δισμουτάσης Cu/Zn, της τυροσινάσης και της λυσιλοξειδάσης [13]. Ωστόσο, υψηλά επίπεδα Cu μπορούν να επάγουν οξειδωτικό στρες. Το ιόν Cu^{2+} παρουσία της ρίζας σουπεροξειδικού ανιόντος ή βιολογικών αναγωγικών μορίων όπως το ασκορβικό οξύ ή η γλουταθειόνη, μπορεί να αναχθεί σε Cu^+ , το οποίο είναι ικανό να καταλύει το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton [14]. Ακόμη τα αυξημένα επίπεδα χαλκού μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα γλουταθειόνης [15].

1.3 Ριβοσώματα και ριβοσωμικές πρωτεΐνες

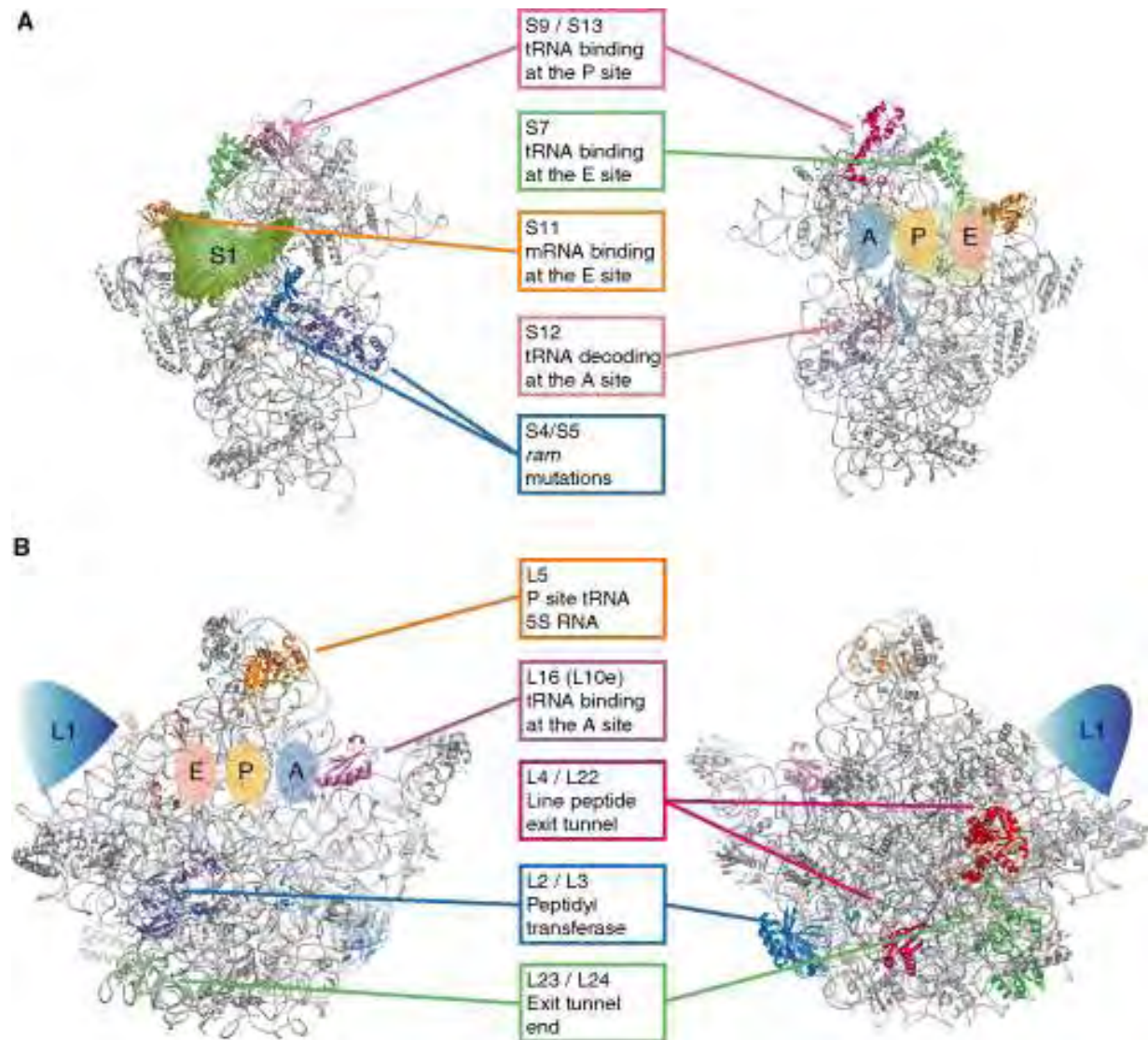
Η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει πλήθος συστατικών και πολλά στάδια. Αν και υπάρχουν ορισμένες σημαντικές διαφορές στην πρωτεϊνοσύνθεση μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών ο βασικός μηχανισμός παραμένει ο ίδιος και επιτελείται από πολύπλοκες ριβονουκλεοπρωτεϊνικές δομές, τα ριβοσώματα. Τα ριβοσώματα αλληλεπιδρούν με μεταφραστικούς παράγοντες, το mRNA και τα αμινοακυλο-tRNAs για να φέρουν εις πέρας το δύσκολο έργο τους. Τα ευκαρυωτικά mRNAs μεταφράζονται είτε μέσω ελεύθερων ριβοσωμάτων είτε μέσω δεσμευμένων στην μεμβράνη ριβοσωμάτων. Τα πρώτα συνθέτουν κατά κύριο λόγο κυτταρικές πρωτεΐνες ενώ τα δεύτερα συνθέτουν εκκριτικές ή μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Η γενετική πληροφορία πρέπει να μεταφράζεται με υψηλή πιστότητα και αυτό επιτυγχάνεται με το ακριβές ταίριασμα των κωδικονίων του mRNA με τα αντίστοιχα αμινοξέα σύμφωνα με τους κανόνες του γενετικού κώδικα. Ένα αμινοξύ πρέπει να προσδεθεί σωστά στο tRNA του, μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από τις αμινοακυλο-tRNA-συνθετάσες, και έπειτα να επιλεγεί σωστά από το ριβόσωμα για να εξασφαλιστεί η πιστότητα της γονιδιακής έκφρασης.

Στους ευκαρυώτες τα ριβοσώματα συνίστανται από δύο υπομονάδες, μία με συντελεστή καθίζησης 40S (μικρή) και μία με συντελεστή 60S (μεγάλη). Η μεγάλη υπομονάδα (LSU – large subunit) έχει περίπου το διπλάσιο μέγεθος από τη μικρή υπομονάδα (SSU – small subunit). Η μικρή υπομονάδα λειτουργεί ως το αποκωδικοποιητικό κέντρο φέρνοντας σε επαφή τα αγγελιοφόρα RNAs και τα tRNAs με σκοπό τη μετάφραση του γενετικού κώδικα. Στους ευκαρυώτες, η μικρή υπομονάδα περιέχει ένα 18S ριβοσωμικό RNA (rRNA) και 33 διαφορετικές ριβοσωμικές πρωτεΐνες τα οποία οργανώνονται σε τρεις ξεχωριστές δομικές επικράτειες: το σώμα, το οποίο περιέχει τη 5' περιοχή του 18S rRNA, την πλατφόρμα, που περιέχει το κεντρικό τμήμα, και το κεφάλι, που περιέχει τη 3' μείζων περιοχή. Η μεγάλη υπομονάδα, στην οποία εδράζεται το κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (PTC) που καταλύει το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, περιέχει 5S rRNA, 5,8S rRNA, 25S-28S rRNA, και 46 (στη ζύμη) ή 47 (στον άνθρωπο) πρωτεΐνες. Η LSU περιλαμβάνει τη κεντρική προεξοχή (CP – central protuberance), τη L1 προεξοχή και τη θηλειά SRL [17].

Καθώς είναι εξακριβωμένο πλέον ότι το rRNA που καταλαμβάνει το κεντρικό μέρος του ριβοσώματος είναι αυτό που καταλύει την όλη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες έχουν λάβει μικρότερο ενδιαφέρον. Η απομόνωση και μελέτη μεμονωμένων ριβοσωμικών πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί δύσκολη υπόθεση κυρίως λόγω των μακριών 'ουρών' τους, μεγάλων προεξοχών που εκτείνονται σε μεγάλο βαθμό και χρησιμεύουν στην αγκυροβόλησή τους στο rRNA. Μετά την αποσαφήνιση της δομής των υπομονάδων 30S και 50S του βακτηριακού ριβοσώματος 70S διαπιστώθηκε ότι η πληθώρα των ριβοσωμικών πρωτεϊνών βρισκόταν στην επιφάνεια του σωματιδίου ενώ το rRNA συστατικό καταλαμβάνει το πυρήνα του. Το γεγονός αυτό έδωσε βάση στη θεωρία ότι οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες είναι απλά 'RNA κόλλα' και ότι επομένως ο μόνος ρόλος τους είναι να υποβοηθούν το rRNA να λάβει τις σωστές τριτοταγείς και τεταρτοταγείς διαμορφώσεις με σκοπό να επιτρέπει τη καταλυτική του λειτουργία. Ωστόσο, μελέτες μεταλλαξιγένεσης που

έχουν γίνει κατά καιρούς έχουν αποδώσει σημαντικές λειτουργίες σε αρκετές ριβοσωμικές πρωτεΐνες, όπως η μικρή ριβοσωμική πρωτεΐνη S12, η οποία ήταν γνωστό ότι είναι απαραίτητη για τη σωστή αποκωδικοποίηση του tRNA στην θέση A του ριβοσώματος. Μάλιστα, μετά τη αποσαφήνιση της δομής των υπομονάδων βρέθηκε ότι πολλές πρωτεΐνες είχαν κατάλοιπα κοντά σε περιοχές καταλυτικής δράσης. Παραδείγματα αποτελούν οι S9 και S13, οι οποίες έχουν ουρές που πλησιάζουν πολύ στη θέση P στην 30S υπομονάδα, οι L2 και L3 οι οποίες σταθεροποιούν το rRNA που περιβάλλει το κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης στην 50S υπομονάδα, και οι L4 και L22 οι οποίες βρίσκονται στο σημείο εξόδου των πεπτιδίων [18].

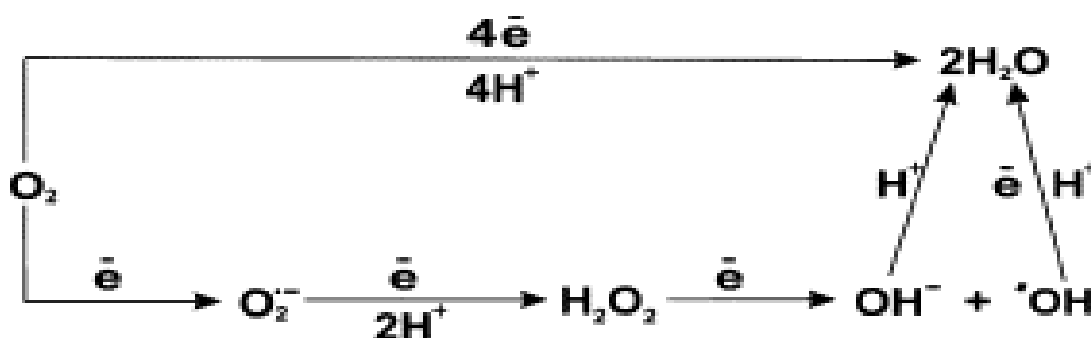


Εικόνα 1. Η συγκεκριμένη εικόνα βασίζεται στο [18] και αποτελεί μια σύνοψη ορισμένων ριβοσωμικών πρωτεϊνών με γνωστού ρόλους. (A) Η βακτηριακή 30S υπομονάδα από τον *Thermus thermophilus*, οπίσθια όψη (αριστερά) και εμπρόσθια όψη (δεξιά) [19]. Η έκταση και η θέση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S1 φαίνεται με πράσινο και βασίζεται στο [20]. (B) Η 50S υπομονάδα του αρχαίου *Haloarcula marismortui*, εμπρόσθια όψη (αριστερά, 30S-προσανατολισμένο) και οπίσθια όψη [21]. Το μέγεθος και η έκταση του L1 μίσχου φαίνεται με μπλε.

1.4 Οξειδωτικό στρες και καρβονυλίωση πρωτεϊνών

1) Ενεργές μορφές οξυγόνου και οξειδωτικό στρες

Η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισοροπίας ενός οργανισμού είναι πολύ σημαντική υπόθεση. Καταστάσεις στις οποίες διαταράσσεται αυτή η ισοροπία μπορεί να αποβούν μοιραίες για τον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια [22]. Τα ασύζευκτα αυτά ηλεκτρόνια είναι πολύ δραστικά που είναι και ο λόγος που οι ρίζες συμμετέχουν πολύ συχνά σε αντιδράσεις. Οι ελεύθερες ρίζες, ωστόσο δε πρέπει να συγχέονται με τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS). Για παράδειγμα το H_2O_2 δεν είναι ρίζα παρ' όλο που αποτελεί μία ενεργή μορφή οξυγόνου. Οι ROS (Reactive Oxygen Species) είναι προϊόντα μερικής αναγωγής του μοριακού οξυγόνου. Συνήθως, το μοριακό οξυγόνο ανάγεται με ένα μηχανισμό τεσσάρων ηλεκτρονίων, μέσω της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, που καταλήγει στο σχηματισμό H_2O . Η προσθήκη όμως ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό του ανιόντος σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) το οποίο ανάγεται περαιτέρω σε H_2O_2 και τελικά στη ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) και το ανιόν υδροξυλίου (OH^-). Η αλυσίδα τελειώνει με το σχηματισμό H_2O μετά την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου και ενός πρωτονίου στη ρίζα $\cdot\text{OH}$.



Εικόνα 2: Δημιουργία των ROS

Όλες οι ROS, όπως το μονοσθενές και μοριακό οξυγόνο, το ανιόν του σουπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου και διάφορα άλλα παράγωγα τους, είναι εξαιρετικά δραστικές και μπορεί να αποβούν ιδιαίτερα καταστροφικές σε μεγαλύτερες από τη σταθερή τους κατάσταση συγκεντρώσεις. Τυπικά, ο μεταβολισμός των ROS ρυθμίζεται από μηχανισμούς του κυττάρου ώστε η ποσότητα ROS που παράγεται να είναι ίση με αυτή που εξαλείφεται. Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όμως, καθώς και λόγω διαφόρων συνθηκών, η συγκέντρωση των ROS μπορεί να αλλάξει οδηγώντας σε μια κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες [23]. Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν εξελιχθεί με ένα πλήθος ενζύμων που είναι εξειδικευμένα για την επανόρθωση οξειδωτικών βλαβών που προξενούνται από τις ROS στις πρωτεΐνες και σε άλλα μακρομόρια., όπως τα λίπη και το DNA.

II) Οξείδωση – καρβονυλίωση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι στόχοι αρκετών μετα-μεταφραστικών επιβλαβών τροποποιήσεων (οξείδωση, γλυκοζυλίωση, προσθήκη προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης) οι οποίες μεταβάλλουν τις βιολογικές τους δραστηριότητες. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι ένας τύπος πρωτεϊνικής οξείδωσης η οποία προάγεται από ενεργές μορφές οξυγόνου.

Συλλογικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν με πάνω από 35 τρόπους (πίνακας 1). Όλες αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα με τρεις βασικούς τρόπους οι οποίοι μπορούν να ταυτοποιηθούν με φασματομετρία μάζας. Ο πρώτος περιλαμβάνει οξειδωτική διάσπαση είτε του κορμού της πρωτεΐνης είτε των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, με τα προλίνη, αργινίνη, λυσίνη, θρεονίνη, γλυταμικό και ασπαρτικό να είναι τα πιο επιρρεπή σε αυτού του τύπου την τροποποίηση. Ένας δεύτερος μηχανισμός αποτελεί η έμμεση προσθήκη προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως το HNE (4-hydroxy-2-nonenal) και η μαλονδιαλδεΐδη, σε πρωτεΐνες. Η μάζα αυξάνεται με αυτού του τύπου την τροποποίηση και είναι μοναδική ανάλογα με το αμινοξύ στο οποίο προστίθεται το οξειδωμένο προϊόν. Τέλος, ο τρίτος τρόπος οξείδωσης των πρωτεϊνών είναι μέσω της παραγωγής των εποκαλούμενων AGE προϊόντων (advance glycation end products). Τα AGE προϊόντα είναι συνήθη σε μακρόβιες πρωτεΐνες, όπως η αιμοσφαιρίνη, ειδικά σε περιπτώσεις όπου τα επίπεδα γλυκόζης και το οξειδωτικό στρες είναι αυξημένα, όπως στον σακχαρώδη διαβήτη. Όλοι αυτοί οι διαφορετικοί μηχανισμοί οξείδωσης συμβαίνουν ταυτοχρόνως [24].

Amino acid	Oxidative modification	Amino acid	Oxidative modification
T	2-amino-3-oxo-butanoic acid	M	sulfone
Y	hydroxylation	L	hydroxy Leucine
R	glutamic semialdehyde	K	aminoadipic-semialdehyde
C	cysteic acid (sulfonic acid)	K	Amadori adduct
C	sulfinic acid	K	3-deoxyglucosone adduct
C	sulfenic acid	K	glyoxal adduct
W	formylkynurenin	K	methylglyoxal adduct
W	kynurenin	N	hydroxylation
W	hydroxykynurenin	P	hydroxylation
W	4,5,6,7 hydroxylation of tryptophan	P	glutamic semialdehyde
W	oxolactone	P	pyroglutamic
H	4-hydroxy glutamate	P	pyrrolidinone
H	asparagines	F	hydroxylation
H	aspartate	F	dihydroxy phenylalanine
H	2-oxo-histidine	K	hydroxylation
D	hydroxylation	C/H/K	hydroxynonenal (HNE) Michael adduct
M	oxidation (sulfoxide)	K	malondialdehyde

Πίνακας 1

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, λοιπόν, μπορεί να συμβεί με τρεις τρόπους, είτε με απευθείας οξείδωση από τις ROS, είτε μέσω Michael προσθήκης λιπιδικών υπεροξειδικών

προϊόντων και μέσω της δημιουργίας AGE προϊόντων. Η οξειδωτική τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων είναι άμεσα συνδεδεμένη με οξείδωση από ROS. Κάθε τέτοια τροποποίηση συνοδεύεται με μια μοναδική αλλαγή μάζας η οποία μπορεί να ενσωματωθεί στα περισσότερα λογισμικά ταυτοποίησης πρωτεϊνών-πεπτιδίων, όπως το πρόγραμμα MaxQuant, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, το μοριακό βάρος του τροποποιημένου πεπτιδίου μπορεί να μοιάζει αρκετά με αυτό του μη τροποποιημένου στο πρωτόμα. Αυτό αντιμετωπίζεται με τη χρησιμοποίηση ενός αναλυτή μάζας υψηλής πιστότητας που να είναι ικανός να διακρίνει μεταξύ πεπτιδίων που φέρουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ατροποποιητών με μόνο γνώμονα τη μάζα τους. Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στις οξειδωμένες πρωτεΐνες είναι η διασταυρωτή σύνδεση. Αυτή μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, όπως δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών μέσω κυστεϊνικής οξείδωσης, δημιουργία βάσης Schiff μεταξύ της καρβονυλικής ομάδας μιας πλευρικής αλυσίδας ενός οξειδωμένου αμινοξέος μιας πρωτεΐνης και ενός καταλοίπου λυσίνης μιας άλλης, δημιουργία βάσης Schiff μεταξύ της καρβονυλικής ομάδας μιας HNE προσθήκης μιας πρωτεΐνης και ενός καταλοίπου λυσίνης μιας άλλης κ.α.

ΣΚΟΠΟΣ

Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας συνεργασίας με το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών και τον καθηγητή Δημήτριο Καλπαξή με απώτερο σκοπό την καλύτερη κατανόηση της απόκρισης του οργανισμού *Mytilus galloprovincialis* σε τοξικούς ρύπους. Ο εν λόγω οργανισμός είναι ένας σημαντικός βιομάρτυρας της θαλάσσιας ρύπανσης, ο οποίος εκτίθεται εκτός των άλλων και σε διάφορα βαρέα μέταλλα. Τα βαρέα μέταλλα προκαλούν οξειδωτικό στρες το οποίο με τη σειρά του, εντός άλλων παρενεργειών προκαλεί και οξείδωση των πρωτεϊνών. Σε ορισμένες από αυτές τις τροποποιημένες πρωτεΐνες η οξείδωση έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση καρβονυλομάδων. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για το κύτταρο καθώς έχουν διαφορετική βιολογική δραστηριότητα.

Η παρούσα εργασία, λοιπόν, είχε ως στόχο τον προσδιορισμό, ποιοτικό και ποσοτικό, των πρωτεϊνών του *Mytilus galloprovincialis* που υπέστησαν καρβονυλίωση ύστερα από την έκθεση του εν λόγω οργανισμού στα βαρέα μέταλλα Cu^{2+} , Hg^{2+} , ή Cd^{2+} , με ιδιαίτερη έμφαση να δίνεται στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες επιλέχθηκαν λόγω του σημαντικού ρόλου τους στη λειτουργία των ριβοσωμάτων, είτε άμεσου για κάποιες είτε έμμεσου για άλλες. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια εργαλείων της βιοπληροφορικής και συγκεκριμένα των προγραμμάτων MaxQuant και Perseus, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε πρωτεομικές μελέτες.

ΜΕΘΟΔΟΙ

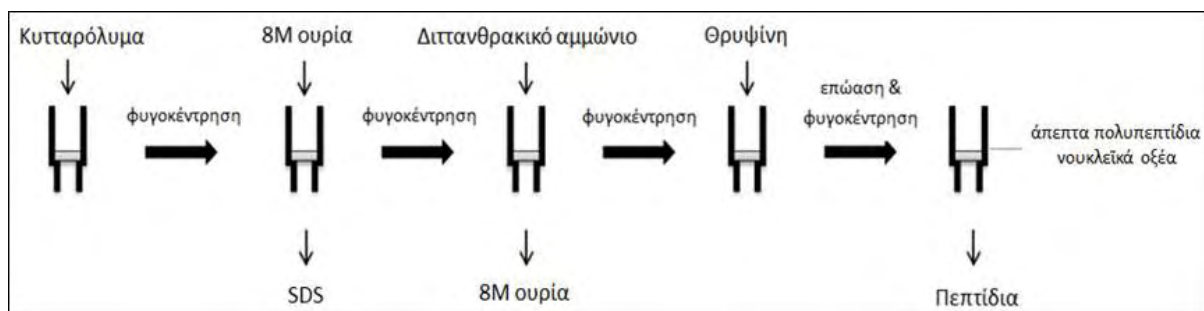
3.1 Επεξεργασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων μέσω φασματομετρίας μάζας

Η φασματομετρία μαζών αποτελεί μια αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού μιας ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μάζας της και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων. Βασίζεται στην παραγωγή δέσμης ιοντικών θραυσμάτων. Τα παραγόμενα θραύσματα διαχωρίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου ή άλλες μεθόδους. Ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) κάθε ιοντικού θραύσματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα θραύσματα έχουν φορτίο $z=1$ και για τον λόγο αυτό ο όρος "λόγος μάζα-προς-φορτίο" αντικαθίσταται από τον όρο μάζα. Αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για πρωτεομικές και μεταβολομικές μελέτες, λόγω της υψηλής ευαισθησίας της.

Ο φασματογράφος μαζών είναι το όργανο, το οποίο προσδιορίζει τη μάζα των συστατικών του δείγματος (σε πρωτεομικές εφαρμογές, αναλύονται κυρίως πεπτίδια). Η μάζα των πρωτεϊνών ή των πεπτιδίων τους, δίνει πληροφορίες για την ταυτότητά τους, τις χημικές τροποποιήσεις τους και τη δομή τους. Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

- 1) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος (το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή την υγρή μορφή),
- 2) την πηγή ιόντων, όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα,
- 3) τον αναλυτή μαζών, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο μάζα/φορτίο (m/z),
- 4) τον ανιχνευτή, που ανιχνεύει φορτισμένα μόρια και έπειτα ενισχύει την απόκριση για να δίνει μετρήσιμο σήμα,
- 5) το σύστημα κενού, το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
- 6) τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό.

Πριν την εισαγωγή των πρωτεϊνικών δειγμάτων στο φασματογράφο μάζας, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των δειγμάτων με χρήση φίλτρου (FASP - filter-aided sample preparation) για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων μορίων από το πρωτεϊνικό δείγμα (όπως άλατα και μόρια απορρυπαντικών ουσιών π.χ. SDS), αλλαγή του διαλύματος, χημική τροποποίηση και πέψη των πρωτεϊνών. Τα τέσσερα κύρια βήματα της διαδικασίας FASP είναι: α) απομάκρυνση των συστατικών μικρού μοριακού βάρους σε διάλυμα που περιέχει ουρία, β) καρβαμιδομεθυλίωση των θειολών, γ) πέψη των πρωτεϊνών με τρυψίνη και δ) έκλυση των πεπτιδίων [25].



Εικόνα 3: Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο FASP.

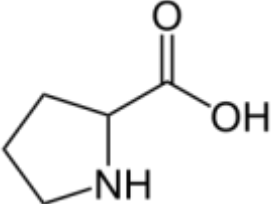
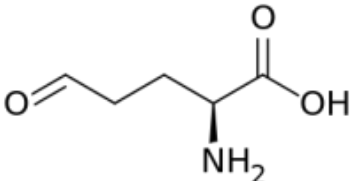
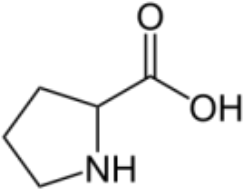
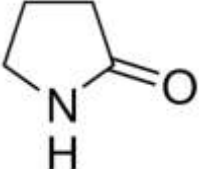
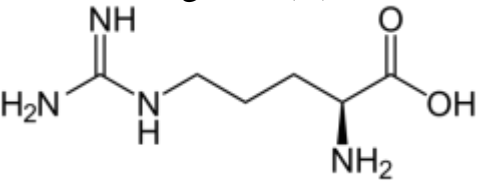
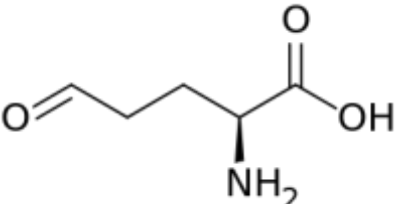
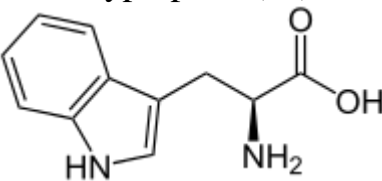
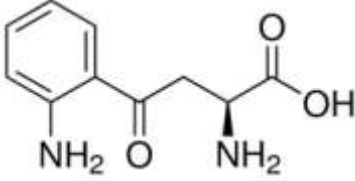
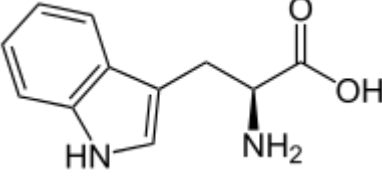
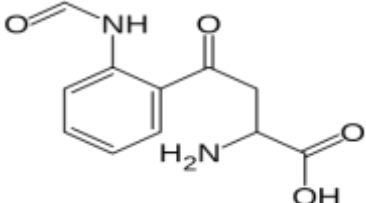
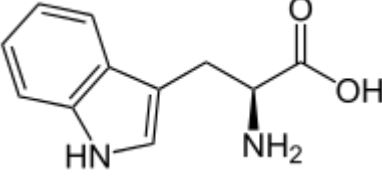
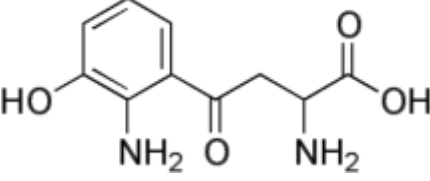
Ο φασματογράφος μάζας που χρησιμοποιήθηκε είναι το υβριδικό όργανο LTQ Orbitrap XL τύπου Μετασχηματισμού Fourier (FTMS). Τα πρωτεϊνικά δείγματα που υποβλήθηκαν σε ανάλυση με φασματομετρία μαζών προέρχονται από πείραμα του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών και είναι σημειωμένα ως εξής:

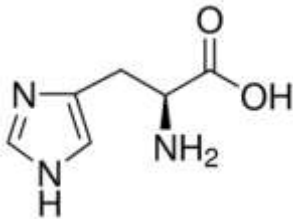
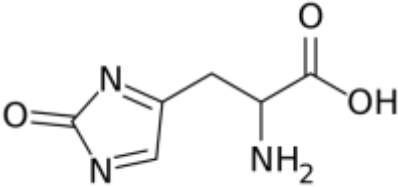
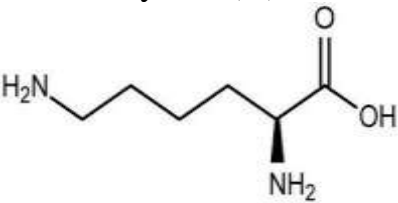
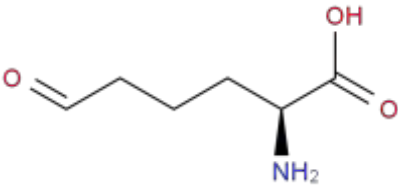
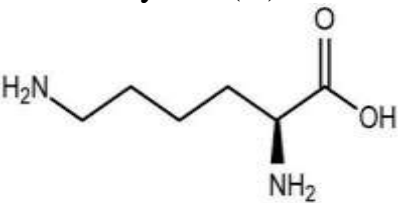
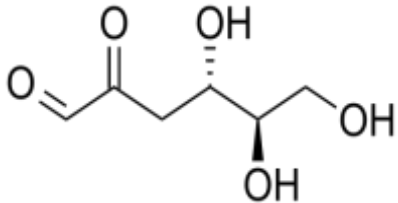
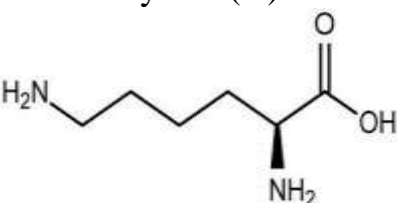

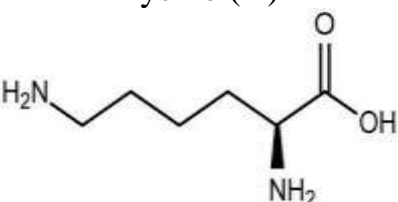
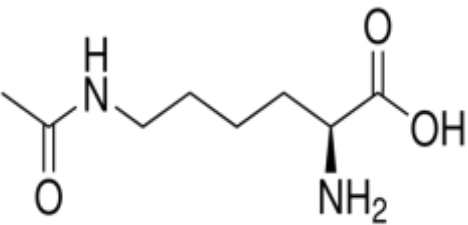
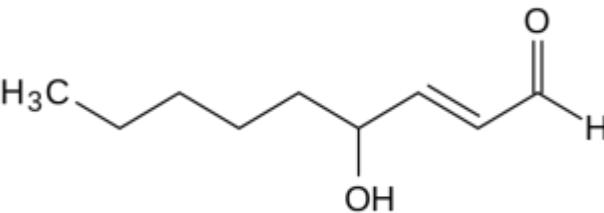
- 1 – Control: το δείγμα – μάρτυρας
- 2 – Cu5: το δείγμα που επώαστηκε με Cu για 5 μέρες
- 3 – Cu15: το δείγμα που επώαστηκε με Cu για 15 μέρες
- 4 – Hg5: το δείγμα που επώαστηκε με Hg για 5 μέρες
- 5 – Hg15: το δείγμα που επώαστηκε με Hg για 15 μέρες
- 6 – Cd5: το δείγμα που επώαστηκε με Cd για 5 μέρες
- 7 – Cd15: το δείγμα που επώαστηκε με Cd για 15 μέρες

3.2 Ανασκόπηση οξειδωτικών τροποποιήσεων αμινοξέων

Προτού αρχίσει η βιοπληροφορική επεξεργασία των αρχείων προηγήθηκε μια ανασκόπηση των σημαντικότερων οξειδωτικών τροποποιήσεων που λαμβάνουν χώρα στα αμινοξέα με ιδιαίτερη έμφαση σε εκείνες που οδηγούν σε καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες. Γενικά τα αμινοξέα υφίστανται πολλές τέτοιες τροποποιήσεις, ωστόσο δεν οδηγούν όλες σε καρβονυλίωση. Επίσης ορισμένα αμινοξέα είναι πιο επιρρεπή σε οξείδωση από τα υπόλοιπα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τροποποιήσεις που είναι οι πιο συνήθεις στη δημιουργία καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών.

Amino acid	Modification
Threonine (T) 	2-Amino-3-ketobutyric acid

<p>Proline (P)</p> 	<p>Glutamic semialdehyde</p> 
<p>Proline (P)</p> 	<p>Pyrrolidinone</p> 
<p>Arginine (R)</p> 	<p>Glutamic semialdehyde</p> 
<p>Tryptophan (W)</p> 	<p>Kynurenine</p> 
<p>Tryptophan (W)</p> 	<p>N-formylkynurenine</p> 
<p>Tryptophan (W)</p> 	<p>Hydroxykynurenine</p> 
<p>Histidine (H)</p>	<p>2-Oxo-histidine</p>

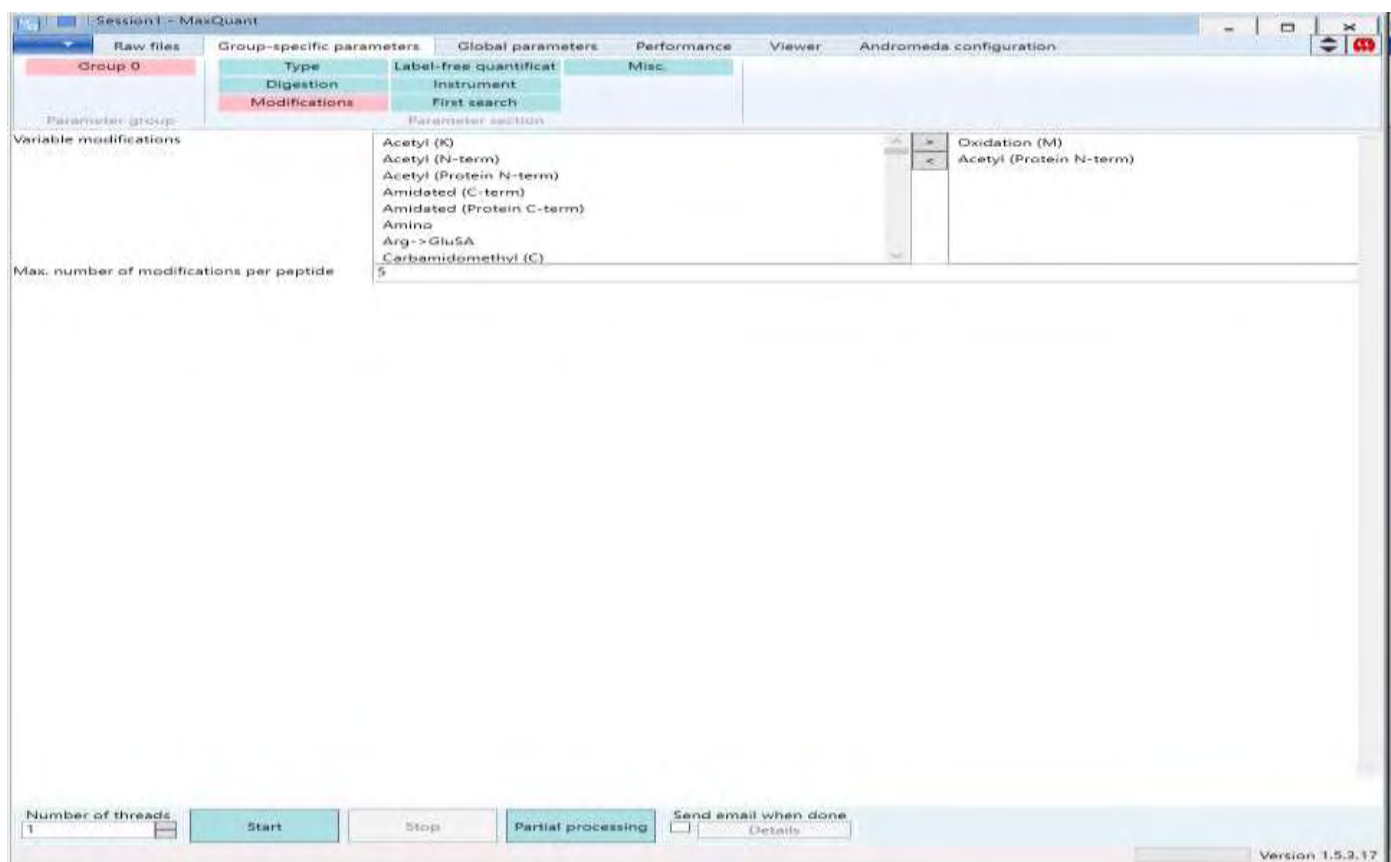
	
Lysine (K)	Aminoadipic semialdehyde
	
Lysine (K)	3-Deoxyglucosone adduct
	
Lysine (K)	Malondialdehyde adduct
	
Lysine (K)	Acetyllysine
	
Cysteine, Histidine, Lysine (C, H, K)	4-Hydroxynonenal (HNE) Michael adduct
	

Πίνακας 2: Οξειδωτικές τροποποιήσεις που οδηγούν σε καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες.

3.2 Εκτέλεση του προγράμματος MaxQuant με τα raw αρχεία

Το MaxQuant είναι ένα λογισμικό πρωτεομικής σχεδιασμένο για αναλύσεις φασματομετρικών δεδομένων μάζας μεγάλης κλίμακας. Είναι εφοδιασμένο με ένα σετ αλγορίθμων, οι οποίοι επιτρέπουν τη ανίχνευση κορυφών και τη βαθμολόγηση πεπτιδίων, πραγματοποιεί βαθμονόμηση μαζών και αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών, ποσοτικοποιεί τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες και παρέχει στατιστικά στοιχεία [26]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 1.5.3.17.

Πριν την εκτέλεση του προγράμματος θα πρέπει να ρυθμίσουμε τις παραμέτρους σύμφωνα με τις οποίες θα λειτουργήσει. Αρχικά, στην επιλογή raw files (εικόνα 4) εισάγουμε τα αρχεία από το φάκελο που τα έχουμε αποθηκευμένα στον υπολογιστή. Αφού φορτώσουμε τα raw αρχεία έχουμε ένα πλήθος επιλογών και παραμέτρων που μπορούμε να αλλάξουμε, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4. Στην κατηγορία Group-specific parameters οι παράμετροι που συνήθως αλλάζουμε είναι το digestion, δηλαδή το είδος της πέψης που θα πραγματοποιηθεί στις πρωτεΐνες, το modifications, όπου επιλέγουμε τι είδους τροποποιήσεις να αναζητηθούν στα πεπτίδια, και το label-free-quantification, για την ποσοτικοποίηση των ανιχνευθέντων πρωτεϊνών. Όλες οι εκτελέσεις που πραγματοποιήθηκαν με το MaxQuant έγιναν με την επιλογή label-free-quantification. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους ποσοτικοποίησης, δεν χρησιμοποιεί κάποιο είδος σήμανσης των πρωτεϊνών (π.χ. με ισότοπα), αλλά τον υπολογισμό της συνολικής έντασης του σήματος του πρόδρομου ιόντος (spectral counts), σαν χρωματογραφική κορυφή.



Εικόνα 4

Στην κατηγορία Global parameters το μόνο πράγμα που συνήθως επιτελούμε είναι να προσθέσουμε ένα ή περισσότερα fasta αρχεία, τα οποία θα χρησιμοποιήσει το πρόγραμμα για να ταυτοποιήσει τις ανιχνευθέντες πρωτεΐνες. Αυτά τα fasta αρχεία ουσιαστικά εμπεριέχουν το πρωτόμα ενός είδους οργανισμού, ενός γένους, μιας οικογένειας ή μιας τάξης, και τα οποία έχουμε κατεβάσει από μια βάση δεδομένων όπως η UniProt ή το NCBI. Τυπικά, στην κατηγορία Andromeda configuration, στο Sequence databases, υπάρχουν αρκετά πρωτόματα από διάφορα είδη οργανισμών. Ωστόσο αν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε για τη μελέτη μας ένα πρωτόμα που δεν υπάρχει στη λίστα της έκδοσης του MaxQuant που χρησιμοποιούμε θα πρέπει να προσθέσουμε μόνοι μας το fasta αρχείο στην εν λόγω κατηγορία και ύστερα να το εισάγουμε στο global parameters.

Ακόμη, στην κατηγορία Andromeda configuration υπάρχει και η λίστα Modifications, στην οποία εμπεριέχονται πάρα πολλές τροποποιήσεις των αμινοξέων, όπως οξειδώσεις, υδροξυλιώσεις, γλυκοζυλιώσεις, όλες οι γνωστές μετατροπές από ένα αμινοξύ σε άλλο κ.α. Ωστόσο, αν επιθυμούμε το MaxQuant να αναζητήσει συγκεκριμένες τροποποιήσεις που δεν υπάρχουν στην παραπάνω λίστα τότε θα πρέπει να τις εισαγάγουμε μόνοι μας.

Στην παρούσα μελέτη χρειάστηκε να εισαχθούν αρκετές εξειδικευμένες οξειδωτικές τροποποιήσεις των αμινοξέων που οδηγούν σε καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για όλες τις τροποποιήσεις του πίνακα 2. Το βασικό στοιχείο που πρέπει να γνωρίζουμε για να καταχωρηθεί σωστά η τροποποίηση στο λογισμικό είναι η διαφορά στη χημική σύσταση μεταξύ του οξειδωμένου καταλοίπου και του φυσιολογικού αμινοξέος. Για παράδειγμα κατά την οξείδωση της τρυπτοφάνης σε κυνουρενίνη προστίθεται ένα οξυγόνο ενώ εξαλείφεται ένας άνθρακας, όπως φαίνεται στον πίνακα 2. Η διαφορά αυτή εισάγεται στο λογισμικό ως C(-1) O. Αναλόγως πραγματοποιήθηκε και για τις λοιπές τροποποιήσεις του πίνακα 2. Εφόσον εισαγάγουμε τη διαφορά της χημικής σύστασης το λογισμικό έπειτα υπολογίζει τη διαφορά μάζας, στην οποία θα στηριχθεί για να ανιχνεύσει τις διάφορες τροποποιήσεις στα αμινοξικά κατάλοιπα των πεπτιδίων. Ακόμη χρειάζεται να ονομάσουμε τυπικά τη συγκεκριμένη τροποποίηση ώστε να μπορούμε να την αναγνωρίσουμε κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων ενώ πρέπει να διευκρινίσουμε επίσης και σε ποιο/ποια αμινοξύ/αμινοξέα συμβαίνει η εκάστοτε τροποποίηση.

Η πρώτη εκτέλεση του MaxQuant πραγματοποιήθηκε με το fasta αρχείο του γένους *Mytilus*, με σκοπό να αποκτήσουμε μια γενική εκτίμηση των πεπτιδίων και πρωτεϊνών του εξεταζόμενου οργανισμού, *Mytilus galloprovincialis*. Στο στάδιο αυτό δεν δόθηκε έμφαση στις τροποποιήσεις των πεπτιδίων. Ωστόσο, επειδή όπως προαναφέρθηκε το γονιδίωμα του *Mytilus galloprovincialis* δεν είναι γνωστό, όπως βέβαια και άλλων οργανισμών του γένους *Mytilus*, με συνέπεια να μην υπάρχουν πολλές διαθέσιμες πρωτεΐνες, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη εκτέλεση χρησιμοποιώντας το fasta αρχείο της τάξης *Bivalvia* (Δίθυρα), με απώτερο σκοπό να ταυτοποιηθούν περισσότερες πρωτεΐνες. Και τα δύο fasta αρχεία προέρχονταν από τη βάση δεδομένων UniProt, καθώς τα αντίστοιχα από το NCBI ήταν προβληματικά με την συγκεκριμένη έκδοση του MaxQuant. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με ένα άλλο πρόγραμμα πρωτεομικής, το Perseus, και παρουσιάζονται στην απόμενη ενότητα.

Σαν δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε εκτέλεση του MaxQuant αρκετές φορές χρησιμοποιώντας το Bionalvia.fasta και θέτοντας όλες τις τροποποιήσεις του πίνακα 2, καθώς και άλλες οξειδωτικές τροποποιήσεις (πίνακας 1), ώστε να ερευνηθούν τα πεπτίδια των πρωτεϊνών που οξειδώθηκαν. Λόγω του υπολογιστικού φόρτου εργασίας κρίθηκε αναγκαίο να γίνουν πολλές ξεχωριστές εκτελέσεις θέτοντας λίγες, 4-5, τροποποιήσεις τη φορά. Σε αυτό το στάδιο δόθηκε ιδιαίτερως έμφαση στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Οπότε, μετά την αποσαφήνιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αρκετών ριβοσωμικών πρωτεϊνών από το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών και την ευγενική χορήγηση τους, ακολούθησαν μερικές επιπλέον εκτελέσεις του MaxQuant. Κατ' αρχάς το αρχείο excel που περιείχε 313 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ριβοσωμικών πρωτεϊνών από τους οργανισμούς *Mytilus galloprovincialis* και *Mytilus trossulus* έπρεπε να μετατραπεί σε αρχείο fasta και κατόπιν να μεταφραστεί σε αμινοξική αλληλουχία. Η μετατροπή επιτεύχθηκε με τη βοήθεια του παρακάτω ιστοτόπου : https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/FORMAT_CONVERSION/form.html [27] ενώ η μετάφραση έγινε με τη χρήση της επιλογής Six-frame translation από τα Tools του προγράμματος MaxQuant. Με το νέο πλέον fasta πραγματοποιήθηκαν 5 εκτελέσεις του MaxQuant με λίγες τροποποιήσεις η κάθε μία, καθώς και μία εκτέλεση που περιείχε όλες τις τροποποιήσεις του πίνακα 2. Τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν, επεξεργάστηκαν με το Perseus και παρουσιάζονται στην απόμενη ενότητα.

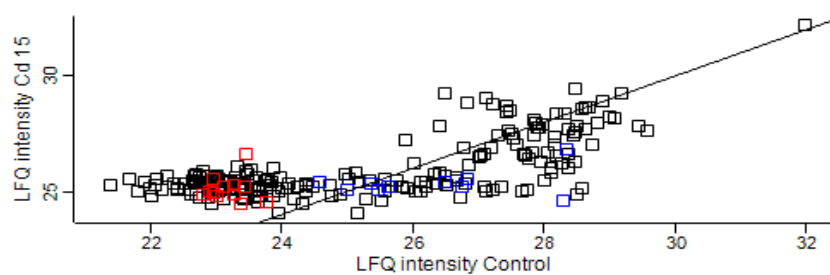
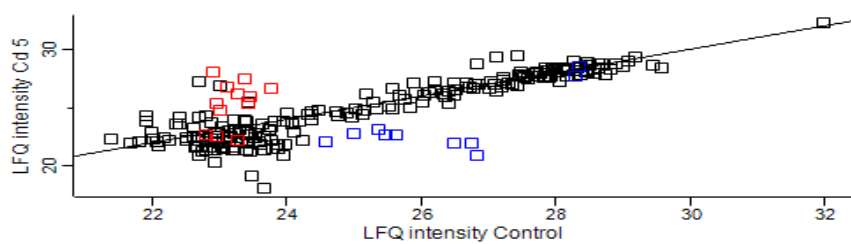
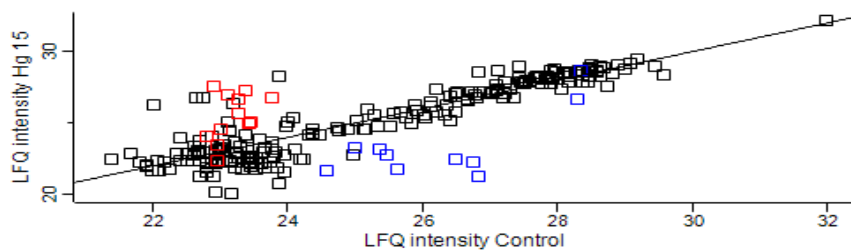
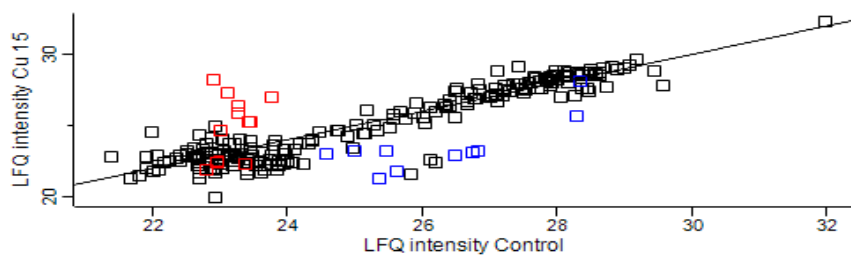
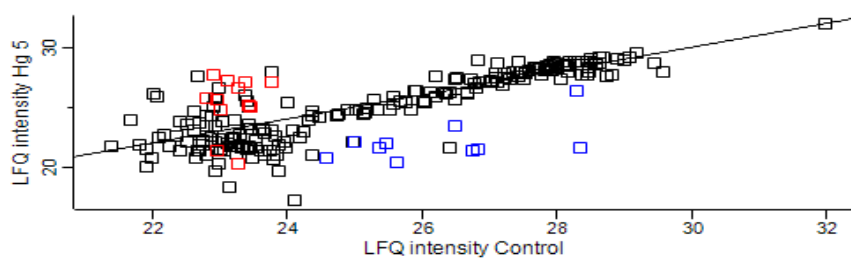
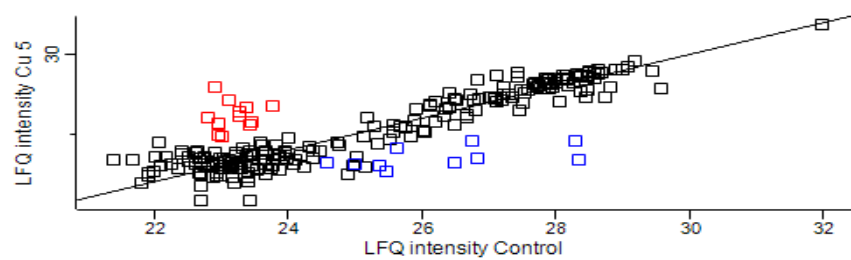
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Στατιστική επεξεργασία των ανιχνευθέντων πρωτεϊνών με το Perseus

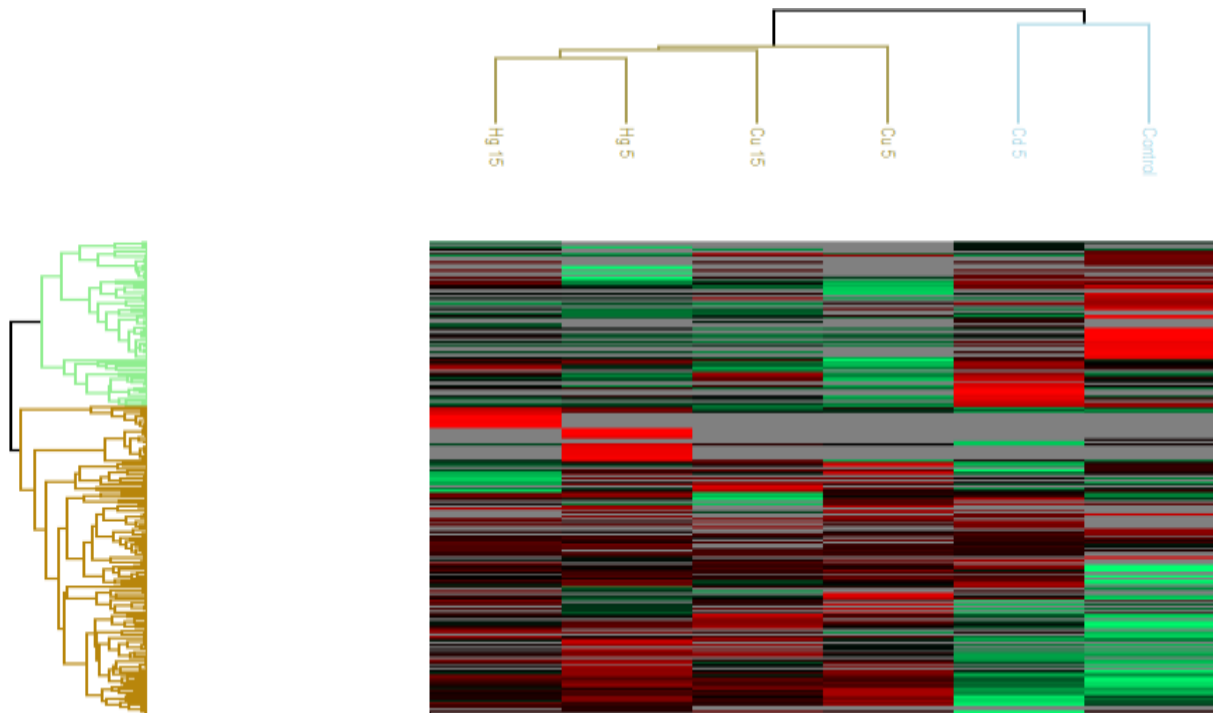
Το πρόγραμμα Perseus είναι ένα λογισμικό στατιστικής ανάλυσης το οποίο ενδείκνυται ιδιαίτερα για την απεικόνιση, ανάλυση και επεξεργασία των προτεομικών δεδομένων που έχουν δημιουργηθεί από το MaxQuant [28]. Το MaxQuant μετά από κάθε εκτέλεση δημιουργεί ένα φάκελο που περιέχει αρκετά txt αρχεία στα οποία εμπεριέχονται στατιστικά δεδομένα. Αυτά τα txt αρχεία μπορούν να φορτωθούν στο Perseus και να αναλυθούν περαιτέρω. Τα txt αρχεία που συνήθως μας ενδιαφέρουν αναγράφονται ως allpeptides, το οποίο περιέχει όλα τα πεπτίδια που δημιουργήθηκαν από τη πέψη με θρυψίνη κατά τη διάρκεια μιας εκτέλεσης του MaxQuant, και proteinGroups, το οποίο περιέχει ομάδες πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν από το MaxQuant. Ο λόγος που το λογισμικό του MaxQuant δημιουργεί ένα αρχείο στο οποίο υπάρχουν ομάδες πρωτεϊνών και όχι μεμονωμένες πρωτεΐνες οφείλεται στο γεγονός ότι το MaxQuant αναζητά και συγκρίνει πεπτίδια με τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών της βάσης δεδομένων που έχουμε επιλέξει. Συνεπώς αν ένα πεπτίδιο είναι κοινό σε πολλές πρωτεΐνες, που συμβαίνει σε συγγενικές και κυρίως σε συντηρημένες πρωτεΐνες μεταξύ των ειδών, τότε το λογισμικό θα τις ενσωματώσει σε μια κοινή ομάδα.

Όταν φορτώνουμε ένα αρχείο txt στο Perseus παρουσιάζεται ένα παράθυρο με πολλές παραμέτρους, αν και αυτό εξαρτάται από το txt αρχείο που ανοίγουμε. Κατά το άνοιγμα με το αρχείο proteinGroups επιλέγουμε όλες τις παραμέτρους της ομάδας LFQ intensity, δηλαδή τα LFQ intensity Control, LFQ intensity Cu5, LFQ intensity Cu15, LFQ intensity Hg5, LFQ intensity Hg15, LFQ intensity Cd5, LFQ intensity Cd15. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται για να απεικονιστούν οι εντάσεις (intensities) των πρωτεϊνών στο Perseus, ώστε να μπορούν να συγκριθούν οι ποσότητες τους μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων. Εκ πρώτης όψεως, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι μετά τη φόρτωση του proteinGroups.txt αρχείου που προερχόταν από την εκτέλεση του MaxQuant με το Bivalvia.fasta απεικονίστηκαν ελάχιστες ομάδες πρωτεϊνών, στο σύνολο 342. Ωστόσο, καθώς το Perseus προσφέρει τη δυνατότητα να φιλτράρουμε τα δεδομένα που απεικονίζονται και να αφαιρέσουμε για παράδειγμα τυχόν μολύνσεις των δειγμάτων, ο πραγματικός αριθμός των ομάδων πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν ήταν 330. Ένας αριθμός αρκετά μικρός αλλά αναμενόμενος καθώς όπως έχει προαναφερθεί το γονιδίωμα του *Mytilus galloprovincialis* δεν είναι γνωστό και συνεπώς πάρα πολλές πρωτεΐνες του οργανισμού αυτού παραμένουν άγνωστες.

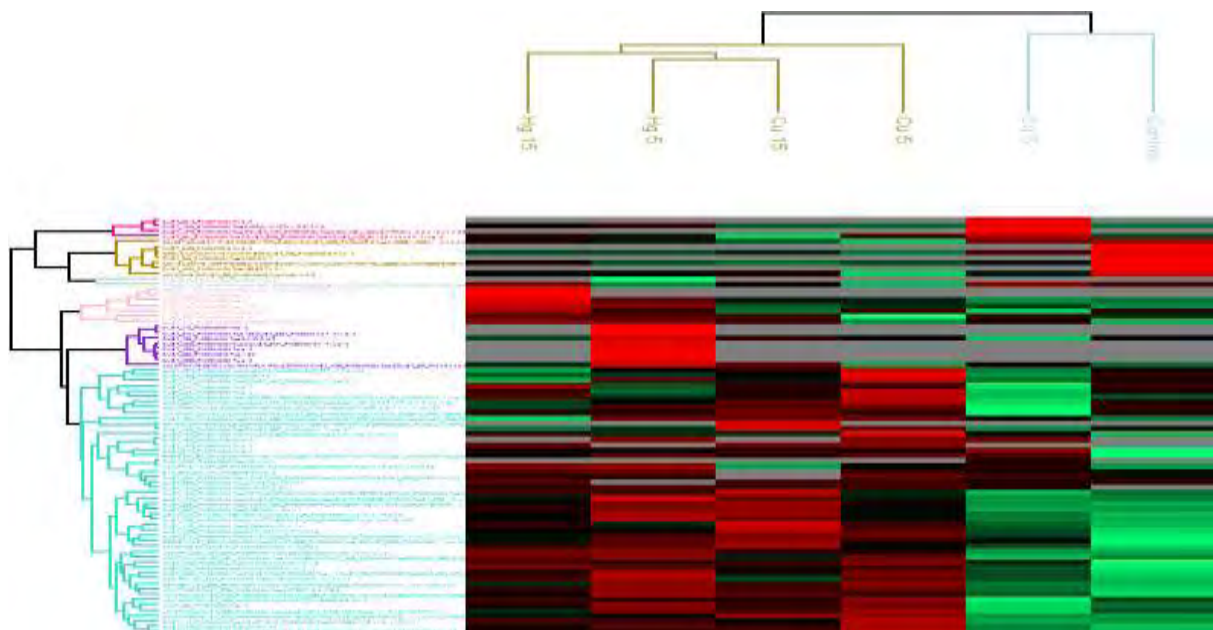
Παρακάτω παρουσιάζονται διαγράμματα τύπου scatter plot τα οποία κατασκευάστηκαν με το Perseus. Σε αυτά απεικονίζεται η ένταση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα που επωάστηκε με κάποιο μέταλλο (κάθετος άξονας) σε σχέση με το μάρτυρα (οριζόντιος άξονας). Όπως φαίνεται το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών δεν παρουσιάζουν κάποια ουσιαστική αύξηση ή μείωση στις εντάσεις τους. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένες που εμφανίζουν μια αυξημένη (κόκκινο χρώμα) ή μειωμένη (μπλε χρώμα) ένταση σε σχέση με το μάρτυρα.



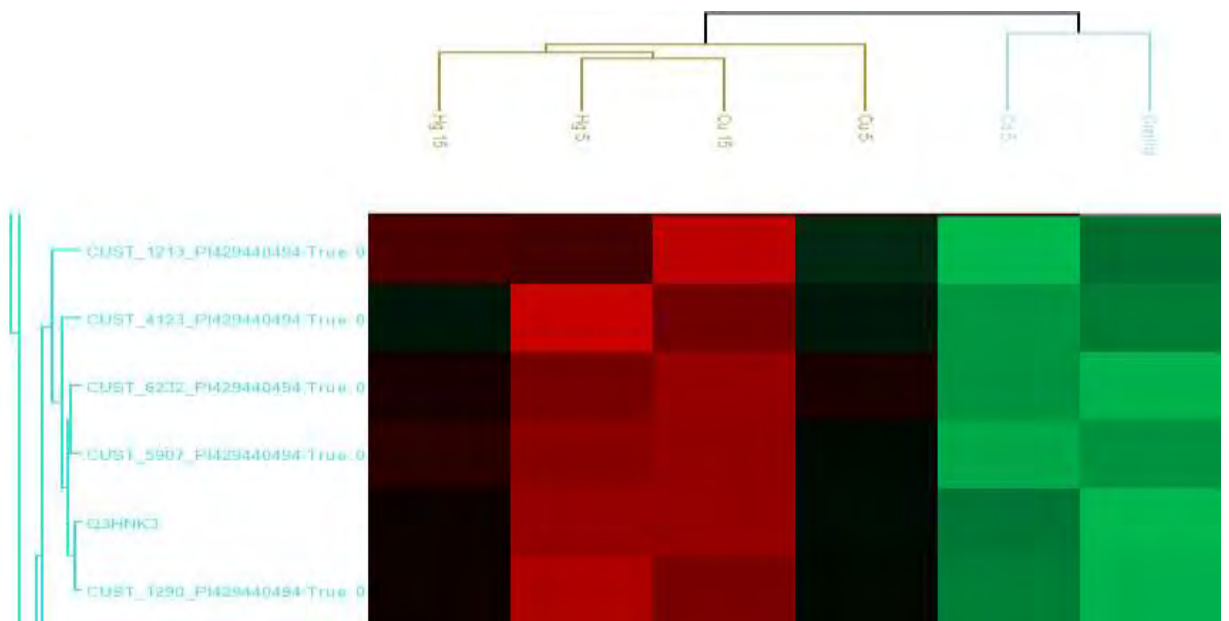
Αυτό που επίσης παρατηρείται στα παραπάνω διαγράμματα είναι ότι το δείγμα Cd 15 παρουσιάζει ασυνήθιστη συμπεριφορά σε σχέση με τα λοιπά δείγματα. Αυτός είναι και ο λόγος που στα clustering διαγράμματα που ακολουθούν, τα οποία επίσης κατασκευάστηκαν με το Perseus, δε λήφθηκε υπόψη το εν λόγω δείγμα. Στα clustering διαγράμματα απεικονίζονται στο πάνω μέρος τα δείγματα και στο αριστερό μέρος οι πρωτεΐνες. Το δείγμα μάρτυρας ομαδοποιήθηκε με το δείγμα Cd 5 διότι παρουσιάζουν σχετικά παρόμοια συμπεριφορά.



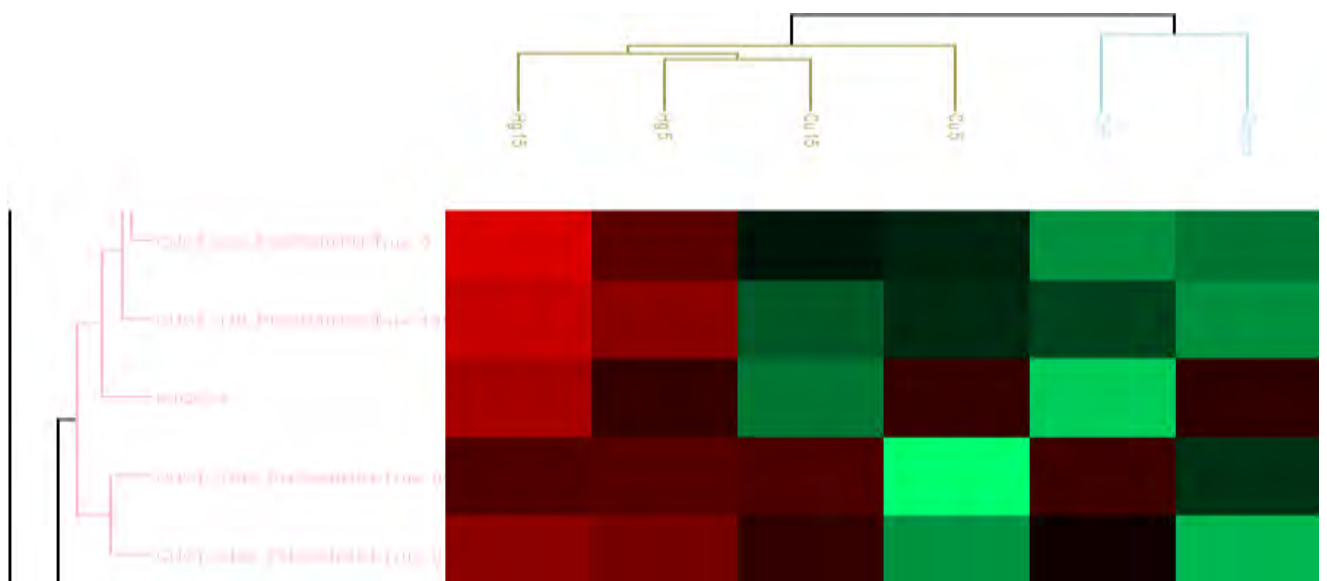
Διάγραμμα clustering 1



Διάγραμμα clustering 2



Διάγραμμα clustering 3



Διάγραμμα clustering 4

Στα clustering διαγράμματα το πράσινο χρώμα υποδηλώνει χαμηλή ένταση, συνεπώς χαμηλή ποσότητα πρωτεΐνης, ενώ όσο σκουραίνει το χρώμα υποδηλώνει αυξημένη ποσότητα, με το έντονο κόκκινο να αποτελεί ιδιαίτερα αυξημένη ποσότητα πρωτεΐνης. Το clustering διάγραμμα 2 κατασκευάστηκε λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Τα clustering διαγράμματα 3 και 4 αποτελούν συγκεκριμένες περιοχές του clustering διαγράμματος 2 που παρουσιάζουν ενδιαφέρον, στις οποίες πραγματοποιήθηκε μεγένθυση. Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες δεν απεικονίζονται με τα ονόματά τους καθώς, επειδή το fasta αρχείο που τις περιείχε δεν προερχόταν από κάποια βάση δεδομένων όπως η UniProt, δεν υπήρχε η δυνατότητα μετατροπής της αυθαίρετης κωδικής ονομασίας τους με το όνομα τους.

Στο διάγραμμα 2 απεικονίζεται αυξημένη η ένταση αρκετών πρωτεϊνών ενώ αρκετά λιγότερων παρουσιάζεται μειωμένη. Στα διαγράμματα 3 και 4 παρατηρούμε μια αύξηση της έντασης των απεικονιζουσών πρωτεϊνών και ιδιαίτερα στα δείγματα που επώαστηκαν με Hg. Συνεπώς, φαίνεται πως τα βαρέα μέταλλα επάγουν γενικά αύξηση στην συγκέντρωση ορισμένων ριβοσωμικών πρωτεϊνών, πιθανώς λόγω ανάγκης για έντονη πρωτεϊνοσύνθεση, με τον Hg να είναι ιδιαίτερα δραστικός. Το Cd όπως προαναφέρθηκε παρουσιάζει ανήθιστη συμπεριφορά. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε κάποιο πειραματικό σφάλμα στα δείγματα που επώαστηκαν με Cd, και ιδιαίτερα στο Cd 15, είτε στο ίδιο το Cd ως στοιχείο, το οποίο μπορεί να έχει πιο βλαπτική επίδραση.

Από το σύνολο των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν, κατά την απεικόνισή τους και ανάλυσή τους με το Perseus επιλέχθηκαν αυτές που παρουσίαζαν κάποιο ενδιαφέρον όσον αφορά διαφορές στις εντάσεις τους στα δείγματα 2 έως 7 σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα. Για να είναι πιο εύκολες οι συγκρίσεις των ποσοτήτων των πρωτεϊνών, καθώς προκαθορισμένα οι ποσότητες αυτές απεικονίζονται στο Perseus με 8 έως και 10ψήφιους αριθμούς, πραγματοποιήθηκε λογαριθμική μετατροπή τους. Κατόπιν δημιουργήθηκε ένας πίνακας (πίνακας 3) με το Microsoft excel όπου απεικονίζονται τα ακόλουθα: οι πρώτες 7 στήλες εμπεριέχουν τις λογαριθμικές ποσότητες των ανιχνευθέντων πρωτεϊνών σε κάθε ένα από τα δείγματα 1-7 (Ctr, Cu5, Cu15, Hg5, Hg15, Cd5, Cd15), οι επόμενες 3 στήλες ορισμένα χαρακτηριστικά για τις πρωτεΐνες όπως ο αριθμός πεπτιδίων και το μοριακό βάρος, και η τελευταία στήλη περιέχει τη κύρια πρωτεΐνη της αντίστοιχης ομάδας, τη πιο αντιπροσωπευτική της ομάδας. Δε απεικονίζεται από ποιον οργανισμό προέρχεται, απλά ότι ανιχνεύθηκε στον *Mytilus galloprovincialis*.

Οι πρωτεΐνες ουσιαστικά που αναγράφονται στον πίνακα 3 είναι οι ίδιες πρωτεΐνες των οποίων οι εντάσεις εμφανίζονται αυξημένες ή μειωμένες στα διαγράμματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες L14, L7, L21, L11 παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση στη συγκέντρωσή τους ενώ οι S15, P1, P2, L12, S29, S11, P0, L21, S13, L13 παρουσιάζουν μια μικρότερου μεγέθους αύξηση. Αντιθέτως, οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες L44, L15, L31, S9 παρουσιάζουν σημαντική μείωση στα επίπεδά τους. Ακόμη αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα επίπεδα της καταλάσης μειώνονται δραματικά ενώ παρόμοια μείωση διαπιστώνουμε και σε ορισμένες άλλες ενδιαφέρουσες πρωτεΐνες όπως η πεπτιδυλ-πρόλυλ *sis-trans* ισομεράση, που προάγει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η αδενοσυλοομοκυστεϊνάση, που συμμετέχει στον μεταβολισμό των αμινοξέων, και η α αλυσίδα της τουμπουλίνης, συστατικό του κυτταροσκελετού. Τέλος, παρατηρούμε και μια αύξηση στην ακτίνη, η οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τα ριβοσώματα.

Control	Cu5	Cu15	Hg5	Hg15	Cd5	Cd15	Peptides	Unique peptides	Mol. weight [kDa]	T: Protein IDs
10	10	10	10	21.779	22.4797	10	2	2	29.155	Elongation factor G
10	10	23.9914	10	10	23.8681	10	2	2	28.496	Fibrinogen-related protein 8
10	25.722	25.3465	24.9927	25.0351	26.159	26.5274	7	7	19.483	Shell myostracum collagen-like protein 1
10	25.6565	25.3469	25.2486	25.1045	25.54	25.2938	4	4	15.167	Collagen-like protein-7
10	10	22.8204	23.0798	23.4643	23.3283	10	2	2	24.478	Nacre apextrin-like protein 1
10	10	20.0152	19.7567	20.2364	20.4426	10	2	2	100.29	TUDOR11
10	10	10	19.699	20.7837	21.6092	10	2	2	19.298	Vacuolar ATP synthase subunit B
10	26.748	10	27.1809	27.2776	27.5475	10	3	3	13.737	Histone H2B
10	26.1333	25.9531	10	25.7108	10	10	2	2	10.612	Putative 60S ribosomal protein L37-A
10	25.7189	10	25.7325	10	25.4286	10	2	2	14.918	60S ribosomal protein L14
10	26.1156	10	25.759	10	10	10	2	1	9.5811	Ribosomal protein L7
10	10	22.9222	10	23.2644	10	10	8	1	25.632	Beta tubulin
10	24.8711	24.7357	24.81	24.6081	24.8143	10	5	2	200.57	Myosin heavy chain, non-muscle
10	23.7192	23.7485	23.9797	23.6795	24.0615	10	8	7	287	Spectrin alpha chain
10	10	10	26.1557	26.3224	10	10	2	2	13.916	Ribosomal protein L31
10	28.0065	28.2819	27.7497	27.6501	28.1533	10	7	2	41.986	Actin, cytoplasmic
10	26.4134	26.4435	26.6803	26.7468	26.1785	10	2	2	18.62	Ribosomal protein L21
10	26.8123	27.0594	27.1068	26.8248	26.6857	10	3	1	19.167	Ribosomal protein L11
17.3155	10	10	10	10	10	10	1	1	411.01	Angiotensin-converting enzyme
23.1243	10	10	10	10	10	10	2	2	12.44	Ribosomal protein L44
23.2105	10	10	10	10	10	10	2	2	22.614	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
23.5286	10	10	10	10	10	10	4	4	47.503	Adenosylhomocysteinase
23.6526	10	10	10	10	10	10	6	0	30.193	Catalase
23.8343	10	10	10	10	10	10	2	2	96.825	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
23.9527	10	10	10	10	10	10	3	3	21.602	Sperm-specific protein PHI-2B
24.1848	23.7443	23.8276	10	10	23.8654	10	2	2	27.524	Peroxisomal protein PEX-4
24.5572	10	10	10	10	10	10	3	3	18.089	60S ribosomal protein L15
25.1397	10	24.4634	24.5829	24.5855	24.7834	10	3	3	25.159	Proteasome subunit alpha type
25.1716	26.0733	26.1301	24.9727	25.982	26.2812	10	5	1	16.855	Ferritin
25.3556	10	10	10	10	10	10	3	3	13.979	60S ribosomal protein L31
25.4549	10	10	10	10	10	10	17	1	50.842	Tubulin alpha chain
25.6263	10	10	10	10	10	10	4	4	21.205	Vitellogenin coat lysin M7
25.8669	25.8848	25.9331	26.4703	26.3334	27.1712	27.279	4	1	17.214	40S ribosomal protein S15
25.8915	26.6636	26.6565	26.3562	25.892	26.3028	10	3	2	11.502	Ribosomal protein P1
26.4774	27.2677	27.5125	27.3674	27.0928	27.1352	29.3056	7	7	11.514	60S acidic ribosomal protein P2
26.4892	10	10	10	10	10	10	4	4	19.996	Vitellogenin coat lysin M7
26.5021	27.2096	27.628	27.5319	27.1993	26.6078	10	4	4	17.569	60S ribosomal protein L12
26.7027	27.5841	27.3259	27.414	27.2278	26.8548	10	2	2	6.2022	40S ribosomal protein S29
26.7445	10	10	10	10	10	10	2	1	24.086	Putative vitelline envelop receptor for lysin
26.8102	10	10	10	10	10	10	10	0	10.934	40S ribosomal protein S9
27.1059	28.7688	28.8616	28.7419	28.7526	29.4384	29.0689	9	9	14.48	ribosomal protein S11
27.4174	28.9466	29.2123	28.7997	29.0629	29.4575	28.7098	6	6	16.706	Chitinase-like protein-3
27.6404	28.2044	28.4985	28.3982	28.2004	28.0222	10	8	8	24.758	Qm-like protein
27.6769	28.2884	28.3375	28.3131	28.3285	27.989	26.6246	11	3	20.715	Ribosomal protein S3
27.8474	28.5017	28.393	28.4818	28.3372	28.461	28.1549	14	11	34.52	60S acidic ribosomal protein P0
27.883	28.5518	28.4755	28.6024	28.6716	28.222	27.8318	6	6	18.767	60S ribosomal protein L21
27.9268	28.0332	28.6119	28.8018	28.8665	28.5133	26.3229	9	9	17.367	40S ribosomal protein S13
27.9637	28.4788	28.8814	28.6945	28.5967	28.3427	27.9075	7	7	24.516	60S ribosomal protein L13
28.0908	28.729	28.9363	28.5897	28.5789	28.4025	26.0579	7	7	8.4429	Putative ribosomal protein S25
28.0989	28.531	28.5701	28.6103	28.5398	28.3143	10	6	6	31.266	Ribosomal protein S2

Πίνακας 3

4.2 Στατιστική επεξεργασία των τροποποιημένων πεπτιδίων των ριβοσωμικών πρωτεϊνών με το Perseus

Μετά από τα διάφορα τρεξίματα του MaxQuant με το fasta αρχείο των ριβοσωμικών πρωτεϊνών ακολούθησε η ανάλυση των allpeptides.txt αρχείων με το Perseus. Αρχικά, πρέπει να αναφερθεί ότι αρκετές ριβοσωμικές πρωτεΐνες εμφανίστηκαν ατροποποίητες όσον αφορά τις τροποποιήσεις του πίνακα 2 παρ' όλο που μπορεί να εμφάνιζαν οξειδωτικές ή άλλου είδους τροποποιήσεις στα πεπτίδια τους (πίνακας 1), οι οποίες ωστόσο, εφόσον δεν οδηγούν σε καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, δεν ελήφθησαν υπόψη. Από τα txt αρχεία που φορτώθηκαν στο Perseus επιλέχθηκαν οι πρωτεΐνες, οι οποίες περιείχαν πεπτίδια που εμφάνιζαν κάποια τροποποίηση από το πίνακα 2. Παρ' όλο που πραγματοποιήθηκαν και ανεξάρτητα τρεξίματα με λίγες τροποποιήσεις κρίθηκε προτιμότερο η ανάλυση να βασιστεί περισσότερο στο εκτέλεση που περιείχε όλες μαζί τις τροποποιήσεις του πίνακα 2. Τα αποτελέσματα των πιο ενδιαφέρουσων πρωτεϊνών, αυτών δηλαδή των οποίων τα πεπτίδια περιείχαν τροποποιήσεις στα δείγματα 2-7 και όχι στο 1-μάρτυρα, παρουσιάζονται στους πίνακες 4-7. Σημειωτέον ότι υπήρχαν μερικές πρωτεΐνες οι οποίες είτε λόγω των συνθηκών της δειγματολειτουργίας – του πειράματος είτε λόγω της ίδιας της φύσης τους περιείχαν τροποποιημένα πεπτίδια στο δείγμα 1 και οι οποίες δεν ελήφθησαν υπόψη.

Στους πίνακες αυτούς, η πρώτη στήλη απεικονίζει τα raw files αριθμημένα 1-7 όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 3.1, η δεύτερη στήλη τη τροποποίηση που είναι παρούσα στο πεπτίδιο της τρίτης στήλης ενώ η θέση της τροποποίησης πάνω στο πεπτίδιο φαίνεται στη τέταρτη στήλη. Η πέμπτη στήλη απεικονίζει τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Στην περίπτωση που ένα πεπτίδιο εμφανίζει τροποποιήσεις στα δείγματα 2-7 αλλά το ίδιο παύσκει από το 1, τότε αναγράφεται ως absent. Στις περιπτώσεις όπου μαζί με το οξειδωμένο πεπτίδιο υπάρχει και το ατροποποίητο τότε αναγράφεται και αυτό.

Raw File	Modification	Peptide Seq	Modified Seq	Protein
1	Absent	Absent	Absent	40S ribosomal protein S3a
2	2 Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone	MFAGQPAPETKPK	MFAGQP(ox)AP(ox)ETK(ly)PK	40S ribosomal protein S3a
3	2 Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone	MFAGQPAPETKPK	MFAGQP(ox)AP(ox)ETK(ly)PK	40S ribosomal protein S3a
4	2 Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone	MFAGQPAPETKPK	MFAGQP(ox)AP(ox)ETK(ly)PK	40S ribosomal protein S3a
5	2 Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone	MFAGQPAPETKPK	MFAGQP(ox)AP(ox)ETK(ly)PK	40S ribosomal protein S3a
6	2 Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone	MFAGQPAPETKPK	MFAGQP(ox)AP(ox)ETK(ly)PK	40S ribosomal protein S3a
7	2 Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone	MFAGQPAPETKPK	MFAGQP(ox)AP(ox)ETK(ly)PK	40S ribosomal protein S3a
1	Unmodified	LVQSPNSYFMDVK	LVQSPNSYFMDVK	ribosomal protein S27
7	Oxidation	LVQSPNSYFMDVK	LVQSPNSYFMDVK(ox)	ribosomal protein S27
7	Unmodified	LVQSPNSYFMDVK	LVQSPNSYFMDVK	ribosomal protein S27
1	Unmodified	NIGIWLRL	NIGIWLRL	60S ribosomal protein L18a
7	Unmodified	NIGIWLRL	NIGIWLRL	60S ribosomal protein L18a
7	Dioxidation (W)	NIGIWLRL	NIGIWL(di)LR	60S ribosomal protein L18a
1	Unmodified	LDQGNFSWGSEAIAR	LDQGNFSWGSEAIAR	40S ribosomal protein S8
7	Unmodified	LDQGNFSWGSEAIAR	LDQGNFSWGSEAIAR	40S ribosomal protein S8
7	Dioxidation (W)	LDQGNFSWGSEAIAR	LDQGNFSW(di)GSEAIAR	40S ribosomal protein S8
7	Trp->Kynurenin	LDQGNFSWGSEAIAR	LDQGNFSW(tr)GSEAIAR	40S ribosomal protein S8
1	Unmodified	QASNFLWPFK	QASNFLWPFK	ribosomal protein L7
7	Unmodified	QASNFLWPFK	QASNFLWPFK	ribosomal protein L7
7	Dioxidation (W)	QASNFLWPFK	QASNFLW(di)PFK	ribosomal protein L7
1	Unmodified	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK	ribosomal protein S18
1	Unmodified	NIMFAMTAIK	NIMFAMTAIK	ribosomal protein S18
3	Oxidation	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK(ox)	ribosomal protein S18
3	Unmodified	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK	ribosomal protein S18
4	Oxidation	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK(ox)	ribosomal protein S18
4	Unmodified	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK	ribosomal protein S18
5	Oxidation	NIMFAMTAIK	NIMFAMTAIK(ox)	ribosomal protein S18
5	Unmodified	NIMFAMTAIK	NIMFAMTAIK	ribosomal protein S18
6	Oxidation	NIMFAMTAIK	NIMFAMTAIK(ox)	ribosomal protein S18
6	Unmodified	NIMFAMTAIK	NIMFAMTAIK	ribosomal protein S18
6	Unmodified	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK	ribosomal protein S18
6	Oxidation	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK(ox)	ribosomal protein S18
7	Oxidation	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK(ox)	ribosomal protein S18
7	Unmodified	FSQVMSNALDNK	FSQVMSNALDNK	ribosomal protein S18
1	Unmodified	TVAGGAWIYSTNAAATVR	TVAGGAWIYSTNAAATVR	60S ribosomal protein L37a
7	Unmodified	TVAGGAWIYSTNAAATVR	TVAGGAWIYSTNAAATVR	60S ribosomal protein L37a
7	Dioxidation (MW)	TVAGGAWIYSTNAAATVR	TVAGGAW(di)IYSTNAAATVR	60S ribosomal protein L37a
7	Trp->Kynurenin	TVAGGAWIYSTNAAATVR	TVAGGAW(tr)IYSTNAAATVR	60S ribosomal protein L37a
1	Unmodified	VNTLIRPDGEKK	VNTLIRPDGEKK	60S ribosomal protein L23a
3	Unmodified	VNTLIRPDGEKK	VNTLIRPDGEKK	60S ribosomal protein L23a
3	Acetyl (K),Oxidation,Thr->2-amino-3-oxobutanoic	VNTLIRPDGEKK	VNT(th)LIR(ox)PDGEK(ac)K	60S ribosomal protein L23a
4	Unmodified	VNTLIRPDGEKK	VNTLIRPDGEKK	60S ribosomal protein L23a
4	Acetyl (K),Oxidation,Thr->2-amino-3-oxobutanoic	VNTLIRPDGEKK	VNT(th)LIR(ox)PDGEK(ac)K	60S ribosomal protein L23a
5	Unmodified	VNTLIRPDGEKK	VNTLIRPDGEKK	60S ribosomal protein L23a
5	Acetyl (K),Oxidation,Thr->2-amino-3-oxobutanoic	VNTLIRPDGEKK	VNT(th)LIR(ox)PDGEK(ac)K	60S ribosomal protein L23a

Πίνακας 4

Raw File	Modification	Peptide Seq	Modified Seq	Protein
1	Unmodified	KSEIEYYAMLAK	KSEIEYYAMLAK	60S ribosomal protein L30
3	Oxidation	SEIEYYAMLAK	SEIEYYAMLAK(ox)	60S ribosomal protein L30
3	Unmodified	SEIEYYAMLAK	SEIEYYAMLAK	60S ribosomal protein L30
4	Oxidation	SEIEYYAMLAK	SEIEYYAMLAK(ox)	60S ribosomal protein L30
4	Unmodified	SEIEYYAMLAK	SEIEYYAMLAK	60S ribosomal protein L30
5	Oxidation	SEIEYYAMLAK	SEIEYYAMLAK(ox)	60S ribosomal protein L30
5	Unmodified	SEIEYYAMLAK	SEIEYYAMLAK	60S ribosomal protein L30
1	Unmodified	IMIAIGGWK	IMIAIGGWK	ribosomal protein S11
2	Unmodified	IMIAIGGWK	IMIAIGGWK	ribosomal protein S11
2	Dioxidation (MW)	IMIAIGGWK	IMIAIGGW(di)K	ribosomal protein S11
3	Unmodified	IMIAIGGWK	IMIAIGGWK	ribosomal protein S11
3	Dioxidation (MW)	IMIAIGGWK	IMIAIGGW(di)K	ribosomal protein S11
6	Unmodified	IMIAIGGWK	IMIAIGGWK	ribosomal protein S11
6	Dioxidation (MW)	IMIAIGGWK	IMIAIGGW(di)K	ribosomal protein S11
1	Absent	Absent	Absent	40S ribosomal protein S4
2	Acetyl (K),Pro->pyro-Glu	PYVSLPRGKGVK	PYVSLP(pr)RGK(ac)GVK	40S ribosomal protein S4
3	Acetyl (K),Pro->pyro-Glu	PYVSLPRGKGVK	PYVSLP(pr)RGK(ac)GVK	40S ribosomal protein S4
4	Acetyl (K),Pro->pyro-Glu	PYVSLPRGKGVK	PYVSLP(pr)RGK(ac)GVK	40S ribosomal protein S4
5	Acetyl (K),Pro->pyro-Glu	PYVSLPRGKGVK	PYVSLP(pr)RGK(ac)GVK	40S ribosomal protein S4
6	Acetyl (K),Pro->pyro-Glu	PYVSLPRGKGVK	PYVSLP(pr)RGK(ac)GVK	40S ribosomal protein S4
1	Unmodified	HGVIPLSTYMK	HGVIPLSTYMK	ribosomal protein L32
3	Oxidation	HGVIPLSTYMK	HGVIPLSTYMK(ox)	ribosomal protein L32
3	Unmodified	HGVIPLSTYMK	HGVIPLSTYMK	ribosomal protein L32
4	Oxidation	HGVIPLSTYMK	HGVIPLSTYMK(ox)	ribosomal protein L32
4	Unmodified	HGVIPLSTYMK	HGVIPLSTYMK	ribosomal protein L32
1	Unmodified	FPLTTESAMK	FPLTTESAMK	60S ribosomal protein L23a
3	Unmodified	FPLTTESAMK	FPLTTESAMK	60S ribosomal protein L23a
3	Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone,Thr->2-amin	IAKFPLTTESAMKK	IAK(ly)FP(ox)LT(th)TESAMKK	60S ribosomal protein L23a
5	Unmodified	FPLTTESAMK	FPLTTESAMK	60S ribosomal protein L23a
5	Oxidation (P),Lys->3-deoxyglucosone,Thr->2-amin	IAKFPLTTESAMKK	IAK(ly)FP(ox)LT(th)TESAMKK	60S ribosomal protein L23a
7	Unmodified	FPLTTESAMK	FPLTTESAMK	60S ribosomal protein L23a
7	Oxidation	FPLTTESAMK	FPLTTESAMK(ox)	60S ribosomal protein L23a
1	Unmodified	VEFLDDSNR	VEFLDDSNR	40S ribosomal protein S28
6	Unmodified	VEFLDDSNR	VEFLDDSNR	40S ribosomal protein S28
6	2 Arg->GluSA	VEFLDDSNRSIIR	VEFLDDSNR(ar)SIIR(ar)	40S ribosomal protein S28
6	Unmodified	DKLQPVKLAK	DKLQPVKLAK	40S ribosomal protein S28
6	Oxidation (P),2 Oxidation	DKLQPVKLAK	DKLQP(ox)VK(ox)LAK(ox)	40S ribosomal protein S28
1	Unmodified	QIMEIKDFLLTAR	QIMEIKDFLLTAR	60S ribosomal protein L38l
3	HNE,Lys->3-deoxyglucosone	QSLPPGLAVKDLK	QSLPPGLAVK(ly)DLK(hn)	60S ribosomal protein L38
4	HNE,Lys->3-deoxyglucosone	QSLPPGLAVKDLK	QSLPPGLAVK(ly)DLK(hn)	60S ribosomal protein L38
5	Oxidation	QIMEIKDFLLTAR	QIMEIK(ox)DFLLTAR	60S ribosomal protein L38
5	HNE,Lys->3-deoxyglucosone	QSLPPGLAVKDLK	QSLPPGLAVK(ly)DLK(hn)	60S ribosomal protein L38
6	HNE,Lys->3-deoxyglucosone	QSLPPGLAVKDLK	QSLPPGLAVK(ly)DLK(hn)	60S ribosomal protein L38
1	Unmodified	GFANIWNAHPK	GFANIWNAHPK	40S ribosomal protein S29
7	Unmodified	GFANIWNAHPK	GFANIWNAHPK	40S ribosomal protein S29
7	Dioxidation (MW)	GFANIWNAHPK	GFANIW(di)NAHPK	40S ribosomal protein S29

Πίνακας 5

Raw File	Modification	Peptide Seq	Modified Seq	Protein
1	Unmodified	MPAAGAGDMFVATVKK	MPAAGAGDMFVATVKK	ribosomal protein L17A
2	Unmodified	MPAAGAGDMFVATVKK	MPAAGAGDMFVATVKK	ribosomal protein L17A
2	Oxidation (P)	MPAAGAGDMFVATVK	MP(ox)AAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
3	Unmodified	MPAAGAGDMFVATVKK	MPAAGAGDMFVATVKK	ribosomal protein L17A
3	Oxidation	MPAAGAGDMFVATVK	MPAAGAGDMFVATVK(ox)	ribosomal protein L17A
3	Oxidation (P)	MPAAGAGDMFVATVK	MP(ox)AAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
4	Unmodified	MPAAGAGDMFVATVKK	MPAAGAGDMFVATVKK	ribosomal protein L17A
4	Oxidation	MPAAGAGDMFVATVK	MPAAGAGDMFVATVK(ox)	ribosomal protein L17A
4	Oxidation (P)	MPAAGAGDMFVATVK	MP(ox)AAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
5	Unmodified	MPAAGAGDMFVATVKK	MPAAGAGDMFVATVKK	ribosomal protein L17A
5	Oxidation	MPAAGAGDMFVATVK	MPAAGAGDMFVATVK(ox)	ribosomal protein L17A
5	Oxidation (P)	MPAAGAGDMFVATVK	MP(ox)AAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
6	Unmodified	MPAAGAGDMFVATVK	MPAAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
6	Oxidation (P)	MPAAGAGDMFVATVK	MP(ox)AAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
7	Unmodified	MPAAGAGDMFVATVK	MPAAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
7	Oxidation	MPAAGAGDMFVATVK	MPAAGAGDMFVATVK(ox)	ribosomal protein L17A
7	Oxidation (P)	MPAAGAGDMFVATVK	MP(ox)AAGAGDMFVATVK	ribosomal protein L17A
1	Unmodified	AGGEIMTFDQLALK	AGGEIMTFDQLALK	ribosomal protein L18
4	Unmodified	AGGEIMTFDQLALK	AGGEIMTFDQLALK	ribosomal protein L18
4	Oxidation	AGGEIMTFDQLALK	AGGEIMTFDQLALK(ox)	ribosomal protein L18
5	Unmodified	AGGEIMTFDQLALKSPR	AGGEIMTFDQLALKSPR	ribosomal protein L18
5	Oxidation	AGGEIMTFDQLALK	AGGEIMTFDQLALK(ox)	ribosomal protein L18
1	Unmodified	ELEVLLMQNR	ELEVLLMQNR	ribosomal protein L32
7	Unmodified	ELEVLLMQNR	ELEVLLMQNR	ribosomal protein L32
7	Oxidation	ELEVLLMQNR	ELEVLLMQNR(ox)	ribosomal protein L32
1	Unmodified	VWLDPNETNEIANANSR	VWLDPNETNEIANANSR	60S ribosomal protein L14
7	Unmodified	VWLDPNETNEIANANSR	VWLDPNETNEIANANSR	60S ribosomal protein L14
7	Trp->Kynurenin	VWLDPNETNEIANANSR	VW(tr)LDPNETNEIANANSR	60S ribosomal protein L14
1	Unmodified	FASATGATPIAGR	FASATGATPIAGR	40S ribosomal protein SA
2	Unmodified	FASATGATPIAGR	FASATGATPIAGR	40S ribosomal protein SA
2	Oxidation (P),Thr->2-amino-3-oxobutanoic acid	FASATGATPIAGR	FASATGAT(th)P(ox)IAGR	40S ribosomal protein SA
3	MDA54,Arg->GluSA	DNLLGKFELTGIPPAPR	DNLLGK(md)FELTGIPPAPR	40S ribosomal protein SA
6	MDA54,Arg->GluSA	DNLLGKFELTGIPPAPR	DNLLGK(md)FELTGIPPAPR	40S ribosomal protein SA
1	Unmodified	MMGTPDIR	MMGTPDIR	ribosomal protein L31
4	Dioxidation (MW)	MMGTPDIR	M(di)MGTPDIR	ribosomal protein L31
5	Dioxidation (MW)	MMGTPDIR	M(di)MGTPDIR	ribosomal protein L31
1	Unmodified	EVSTNDMKEVVNK	EVSTNDMKEVVNK	ribosomal protein S3a
1	Unmodified	NVLTNFGMDLTR	NVLTNFGMDLTR	ribosomal protein S3a
4	Oxidation	NVLTNFGMDLTR	NVLTNFH(ox)GMDLTR	ribosomal protein S3a
4	Oxidation	EVSTNDMKEVVNK	EVSTNDMK(ox)EVV NK	ribosomal protein S3a
4	Unmodified	NVLTNFGMDLTR	NVLTNFGMDLTR	ribosomal protein S3a
5	Unmodified	EVSTNDMKEVVNK	EVSTNDMKEVVNK	ribosomal protein S3a
5	Oxidation	EVSTNDMKEVVNK	EVSTNDMK(ox)EVV NK	ribosomal protein S3a
5	Dioxidation (MW)	WQTLIEANVDVR	W(di)QTLIEANVDVR	ribosomal protein S3a
7	Oxidation	NVLTNFGMDLTR	NVLTNFH(ox)GMDLTR	ribosomal protein S3a

Πίνακας 6

Raw File	Modification	Peptide Seq	Modified Seq	Protein
1	Absent	Absent	Absent	60S ribosomal protein L6
2	Oxidation (P),Oxidation	LPERVNDK	LP(ox)ER(ox)VNDK	60S ribosomal protein L6
4	Oxidation (P),Oxidation	LPERVNDK	LP(ox)ER(ox)VNDK	60S ribosomal protein L6
1	Unmodified	TKEAVALLK	TKEAVALLK	60S ribosomal protein L4
5	Unmodified	TKEAVALLKK	TKEAVALLKK	60S ribosomal protein L4
5	Thr->2-amino-3-oxobutanoic acid	KTKEAVALLK	KT(th)KEAVALLK	60S ribosomal protein L4
6	Unmodified	TKEAVALLKK	TKEAVALLKK	60S ribosomal protein L4
6	Thr->2-amino-3-oxobutanoic acid	KTKEAVALLK	KT(th)KEAVALLK	60S ribosomal protein L4
1	Absent	Absent	Absent	60S ribosomal protein L5
2	Oxidation (P)	RFPGFDGSEFK	RFP(ox)GFDGSEFK	60S ribosomal protein L5
3	Oxidation (P)	RFPGFDGSEFK	RFP(ox)GFDGSEFK	60S ribosomal protein L5
4	Oxidation (P)	RFPGFDGSEFK	RFP(ox)GFDGSEFK	60S ribosomal protein L5
6	Oxidation (P)	RFPGFDGSEFK	RFP(ox)GFDGSEFK	60S ribosomal protein L5
1	Unmodified	VANVSLWALFK	VANVSLWALFK	40S ribosomal protein S23
3	Dioxidation (MW)	VANVSLWALFK	VANVSLW(di)ALFK	40S ribosomal protein S23
3	Unmodified	VANVSLWALFK	VANVSLWALFK	40S ribosomal protein S23
4	Dioxidation (MW)	VANVSLWALFK	VANVSLW(di)ALFK	40S ribosomal protein S23
4	Unmodified	VANVSLWALFK	VANVSLWALFK	40S ribosomal protein S23
5	Dioxidation (MW)	VANVSLWALFK	VANVSLW(di)ALFK	40S ribosomal protein S23
5	Unmodified	VANVSLWALFK	VANVSLWALFK	40S ribosomal protein S23
6	Dioxidation (MW)	VANVSLWALFK	VANVSLW(di)ALFK	40S ribosomal protein S23
6	Unmodified	VANVSLWALFK	VANVSLWALFK	40S ribosomal protein S23
7	Dioxidation (MW)	VANVSLWALFK	VANVSLW(di)ALFK	40S ribosomal protein S23
7	Unmodified	VANVSLWALFK	VANVSLWALFK	40S ribosomal protein S23
1	Unmodified	LWSLVSDQTR	LWSLVSDQTR	60S ribosomal protein L27a
7	Unmodified	LWSLVSDQTR	LWSLVSDQTR	60S ribosomal protein L27a
7	Dioxidation (MW)	LWSLVSDQTR	LW(di)SLVSDQTR	60S ribosomal protein L27a
1	Unmodified	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK	40S ribosomal protein S17
2	Oxidation	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK(ox)	40S ribosomal protein S17
2	Unmodified	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK	40S ribosomal protein S17
3	Unmodified	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK	40S ribosomal protein S17
3	Oxidation	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK(ox)	40S ribosomal protein S17
4	Unmodified	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK	40S ribosomal protein S17
4	Oxidation	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK(ox)	40S ribosomal protein S17
5	Unmodified	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK	40S ribosomal protein S17
5	Oxidation	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK(ox)	40S ribosomal protein S17
7	Unmodified	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK	40S ribosomal protein S17
7	Oxidation	VAGFVTHLMK	VAGFVTHLMK(ox)	40S ribosomal protein S17
1	Absent	Absent	Absent	60S ribosomal protein L24
2	Acetyl (K),2 Oxidation	EQAIRAAKEK	EQAIR(ox)AAK(ac)EK(ox)	60S ribosomal protein L24
4	Acetyl (K),2 Oxidation	EQAIRAAKEK	EQAIR(ox)AAK(ac)EK(ox)	60S ribosomal protein L24
6	Acetyl (K),2 Oxidation	EQAIRAAKEK	EQAIR(ox)AAK(ac)EK(ox)	60S ribosomal protein L24
7	Unmodified	NINWTVLYR	NINWTVLYR	60S ribosomal protein L24
7	Dioxidation (MW)	NINWTVLYR	NINW(di)TVLYR	60S ribosomal protein L24

Πίνακας 7

Από τον πίνακα 4 η ριβοσωμική πρωτεΐνη S3a εμφανίζει στο πεπτίδιο που ανιχνεύθηκε οξειδώσεις στις προλίνες και προσθήκη της δεοξυγλυκοσόνης στις λυσίνες, βέβαια επειδή στο μάρτυρα δεν ανιχνεύθηκε το εν λόγω πεπτίδιο δεν είναι 100% αξιόπιστη. Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη είναι η S18 στην οποία υπάρχουν 2 πεπτίδια που είναι ατροποϊήτα στο μάρτυρα αλλά περιέχουν οξειδώσεις στις λυσίνες τους στα 2-7 ενώ συγχρόνως σε αυτά τα δείγματα ανιχνεύθηκαν και ατροποϊήτες μορφές των πεπτιδίων αυτών. Η ριβοσωμική πρωτεΐνη L23a περιέχει ένα πεπτίδιο ατροποποϊήτο στο δείγμα 1 το οποίο έπειτα εμφανίζει πολλαπλές τροποποιήσεις στα δείγματα 3-5.

Άλλες ενδιαφέρουσες πρωτεΐνες των υπόλοιπων πινάκων αποτελούν οι L30, S11, L32, L17, L18, S23, S17. Γενικά διαφαίνεται μια τάση στις οξειδωτικές τροποποιήσεις των αμινοξέων με τα λυσίνη, προλίνη, θρεονίνη και τρυπτοφάνη να είναι τα πιο επιρρεπή σε οξείδωση. Στο σύνολό τους οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες με κάποιο καθορισμένο πρότυπο οξείδωσης, δηλαδή ένα πρότυπο που να συμβαδίζει με το οξειδωτικό στρες που δυνητικά δημιουργούν τα βαρέα μέταλλα στα διάφορα δείγματα είναι λίγες. Με άλλα λόγια, το ιδανικό πρότυπο θα ήταν ένα κατά το οποίο ένα πεπτίδιο μιας πρωτεΐνης θα εμφανιζόταν ατροποποϊήτο στο δείγμα 1 και τροποποιημένο είτε σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα είτε στα δείγματα που επώαστηκαν με το ίδιο μέταλλο. Όπως φαίνεται από τους παρακάτω πίνακες τέτοιες πρωτεΐνες αποτελούν οι S18, L32, L17, L18, S23, S17.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Gosling EM: Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Oxford; Malden, MA: Fishing News Books; 2003.
- [2] Saavedra C, Bachere E: Bivalve genomics. *Aquaculture* 2006, 256(1–4):1-14.
- [3] Elder JF, Collins JJ: Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1991;122:37-79
- [4] Waykar B, Shinde SM: Assessment of the metal bioaccumulation in three species of freshwater bivalves. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2011 Sep;87(3):267-71
- [5] Paul B T, Clement G Y, Anita K P, Dwayne J S: Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS*. 2012 ; 101: 133–16
- [6] WHO/FAO/IAEA. World Health Organization. Switzerland: Geneva; 1996. Trace Elements in Human Nutrition and Health.
- [7] Stern BR: Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *Toxicol Environ Health A*. 2010; 73(2):114–127.
- [8] Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M: Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2001;20(2):77-88.
- [9] Ma WL, Wang L, He YJ, Yan T (2008): Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium. *Environ Toxicol* 23: 393–400.
- [10] Silvestre F, Duchêne C, Trausch G, Devos P (2005): Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during the acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp Biochem Physiol C* 140: 39–45.
- [11] Li Y, Yang H, Liu N, Luo J, Wang Q, Wang L (2015): Cadmium Accumulation and Metallothionein Biosynthesis in Cadmium-Treated Freshwater Mussel *Anodonta woodiana*. *PLoS ONE* 10(2): e0117037.
- [12] Ralph, A. and McArdle, H.J. (2001) New York: International Copper Association
- [13] Osredkar J, Sustar N (2011) Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clin Toxicol* S3:001.
- [14] Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M: Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1991 Feb 1;273 (Pt 3):601-4.

- [15] Speisky H, Gómez M, Burgos-Bravo F, López-Alarcón C, Jullian C, Olea-Azar C, Aliaga ME: Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg Med Chem*. 2009 Mar 1;17(5):1803-10.
- [16] Garrett R, Douthwaite S, Liljas A, Matheson A, Moore P & Noller H (2000): *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. ASM Press, Washington DC
- [17] Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Ban N: Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci*. 2012 May;37(5):189-98.
- [18] Brodersen DE¹, Nissen P: The social life of ribosomal proteins. *FEBS J*. 2005 May;272(9):2098-108.
- [19] Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM Jr, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonnrhein C, Hartsch T & Ramakrishnan V (2000): Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327–339.
- [20] Sengupta J, Agrawal RK & Frank J (2001): Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11991–11996.
- [21] Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB & Steitz TA (2000): The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905–920.
- [22] B. Halliwell: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*. 1989 Dec; 70(6): 737–757.
- [23] Lushchak VI Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*. 2011 Jan 17;101(1):13-30.
- [24] Madian AG, Regnier FE: Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res*. 2010 Aug 6;9(8):3766-80.
- [25] Van Bramer, S.E., *An Introduction to Mass Spectrometry, Manual of Mass Spectrometry*
- [26] Cox, J. and Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 2008, 26, pp 1367-72.
- [27] https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/FORMAT_CONVERSION/form.html
- [28] http://www.zmbh.uniheidelberg.de/Central_Services/Mass_Spectrometry/PDF/150206%20Perseus%201.5.1.5%20Tutorial_Version2.pdf